

**Contribution à l'Etude
de l'Action Dépressive Centrale
de la 4-Butyrolactone**

**Butyrolactone et Carence
en Pyridoxine chez le Rat**

THÈSE

POUR LE DOCTORAT D'ÉTAT EN PHARMACIE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 7 AVRIL 1965

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

DUBROCARD Simone

Née le 27 Décembre 1938 à AUBENAS (Ardèche)



IMPRIMERIE DES BEAUX-ARTS

TIXIER & FILS, 19, RUE ROUX-SOIGNAT, LYON

1965

**Contribution à l'Etude
de l'Action Dépressive Centrale
de la 4 - Butyrolactone**

**Butyrolactone et Carence
en Pyridoxine chez le Rat**

THÈSE

POUR LE DOCTORAT D'ÉTAT EN PHARMACIE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 7 AVRIL 1965

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

DUBROCARD Simone

Née le 27 Décembre 1938 à AUBENAS (Ardèche)



PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyens honoraires :

MM. J. LÉPINE
H. HERMANN

Doyen :

J.F. CIER

Membre de l'Institut.
Correspondant de l'Institut.

Assesseurs : MM. M. LEVRAT
L. REVOL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. GUIART, PATEL, LÉPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL,
GARIN, GATÉ, MARTIN, GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET,
HERMANN, ROCHET, POLLOSSON

PROFESSEURS

MM. CIBERT	Clinique urologique
PONTHUS	Physique biologique
(détaché à Beyrouth)	
DECHAUME	Clinique neuro-psychiatrique et d'Hygiène mentale
CHAMBON	Chimie organique et Toxicologie
WERTHEIMER	Clinique chirurgicale B
PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
FROMENT	Clinique et Prophylaxie cardio-vasculaires
CROIZAT	Clinique médicale C
ENSELME	Chimie biologique et médicale
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
REVOL	Pharmacie galénique
PIGEAUD	Clinique obstétricale
BOURRET	Médecine du Travail
LEVRAT	Clinique médicale A
SOHIER	Hygiène et Action sanitaire et sociale
NETIEN	Botanique et cryptogamie
BERTRAND	Clinique chirurgicale C
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
DREVON	Pharmacie chimique et pharmacologie
ROCHE	Médecine légale et déontologie
COUDERT	Parasitologie et Pathologie exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique d'oto-rhino-laryngologie et d'audio-phonologie
PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique
THIERS	Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie
BRUN	Clinique de pneumo-phthisiologie
CREYSSEL J.	Clinique traumatologique des membres
DARGENT	Clinique carcinologique
GUICHARD	Anatomie pathologique
GIRARD P.	Pathologie générale et expérimentale
LATARJET	Anatomie
PEYCELON	Pathologie chirurgicale
GIRARD M.	Thérapeutique
VACHON	Pathologie médicale
GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires
PAPILLON	Radiologie
JEUNE	Clinique infantile et hygiène du premier âge
GONIN	Hydrologie thérapeutique, Climatologie et Ecologie sociale
MONNET	Bactériologie
BANSSILLON	Physiologie et pathologie obstétricales
CHATONNET	Physiologie B
GUINET	Clinique endocrinologique
TRILLAT	Clinique de Chirurgie orthopédique
FREIDEL	Clinique Stomatologique
MARION J.	Clinique de Chirurgie et d'Orthopédie infantiles
DORCHE	Matière médicale et législation pharmaceutique
DUMONT L.	Histologie et embryologie
PERROT	Chimie
CIER J.F.	Physiologie A
PERRIN J.	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire
MICHAUD P.	Clinique de Chirurgie cardiaque
SARROUY C.	Clinique médicale infantile
X...	Clinique gynécologique
X...	Thérapeutique
X...	Clinique des maladies infectieuses
X...	Biologie médicale et pharmacodynamie

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

MM. BERGER	Physique nucléaire appliquée à la médecine
BERTOYE A.	Bactériologie
MANSUY	Neuro-chirurgie
COLLET	Chimie générale et pharmaceutique
LACROIX	Hygiène et climatologie
LIARAS	Clinique chirurgicale propédeutique
LECUIRE	Neuro-chirurgie
REVOL	Médecine générale
GOINARD	Thérapeutique chirurgicale
CIER A.	Pharmacie chimique et Pharmacologie
PONT M.	Médecine générale

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

MM. ROMAN	Parasitologie	MM. De SOLLIERS	Chimie analytique
FEROLDI	Anatomie pathologique	DESPIERRES	Médecine générale
MORET	Physique biologique	GARIN	Parasitologie
ODDOUX	Botanique et cryptogamie	TOLOT	Médecine du Travail

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS TITULAIRES

MM. CREYSSEL R.	Chimie biologique	MM. MICHEL	Anesthésiologie
THIVOLET	Hygiène	GILLY	Pédiatrie
PINET	Electro-radiologie	BOUCHET	Anatomie
GUYOTAT	Neuro-psychiatrie	ROBERT	Médecine générale
DESCOTES	Chirurgie générale	R. FRANÇOIS	Pédiatrie et Puériculture
JOUVET	Pathologie expérimentale	COLOMB	Dermatologie
PEYRIN	Physique biologique	FRIES	Médecine générale
TOMMASI	Anatomie pathologique	LAMBERT	Médecine générale
BUFFARD	Electro-radiologie	MICHOULIER	Chirurgie générale
LEJEUNE	Méd. gén. et thérapeutique	BETHENOD	Pédiatrie
de MOURGUES F.	Stomatologie	GERMAN	Immunologie, sérologie, hématologie
NAUSSAC	Maladies infectieuses	KALB	Pneumo-phthisiologie
REBOUILLAT	Chirurgie générale	LARBRE	Pédiatrie
ROMAGNY	Pédiatrie	SOUSTELLE	Chirurgie générale
DELAHAYE J.	Médecine générale	VIALA	Médecine générale
DELEUZE R.	Anesthésiologie	VINCENT	Bactériologie, parasitologie, virologie
GIRAUD M.	Electro-radiologie diagnostique et thérapeutique.		

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS STAGIAIRES

MM. FAVRE-GILLY	Hématologie	MM. FAUCON	Biologie médicale et pharmacodynamie
GIROD	Histologie et embryologie	FLANDROIS	Physiologie
GRAS	Chimie biologique	VIALIER-RAYNARD	Bactériologie
MALLEIN	Chimie analytique	ROLLET	Pharmacie galénique
RIFFAT	Hygiène		

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. BONAMOUR	Ophtalmologie	MM. GAILLARD	Oto-rhino-laryngologie
COLIN	Médecine légale	GARDE	Médecine générale
De MOURGUES G.	Chirurgie générale	HUGONNIER	Ophtalmologie
DEVIC	Médecine générale	MARET	Chirurgie générale
DUMONT M.	Obstétrique	MORNEX	Médecine générale
DURAND	Urologie	NORMAND	Médecine générale
FRANCILLON	Chirurgie générale	PERRIN A.	Médecine générale
SAUBIER	Chirurgie générale	DUMAS	Stomatologie
SCHOTT	Neuro-psychiatrie	GARMIER	Obstétrique
ALLEGRE	Neuro-chirurgie	NOEL	Médecine générale
CHASSARD	Electro-radiologie	SCHNEPP	Orthopédie
FAYSSE	Orthopédie		

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. A CIER, Président ; B. DREVON, J. DORCHE, M. JOUVET, Assesseurs

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A MES PARENTS

Faible témoignage de ma profonde affection.

A MA GRAND-MÈRE

A MA GRAND-TANTE

A MA FAMILLE

A MES AMIS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur A. CIER

Chevalier de la Légion d'Honneur

Nous le remercions de l'honneur qu'il nous a fait d'accepter la présidence de cette thèse.

Il nous a réservé, lors de notre arrivée dans le laboratoire de Pharmacie Chimique et Pharmacologie un accueil chaleureux.

Instigateur de ce travail, il nous a suivi dans sa réalisation, en nous apportant une aide précieuse, et en nous témoignant un inlassable dévouement.

Qu'il veuille trouver ici, l'expression de notre profonde gratitude.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY

Monsieur le Professeur B. DREVON

Officier de la Légion d'Honneur

C'est un grand honneur qu'il nous fait en acceptant de juger ce travail. Nous avons eu le privilège de bénéficier de la richesse de son enseignement, et nous lui sommes reconnaissante de la bienveillante indulgence qu'il nous a toujours prodiguée. Nous ne saurions assez lui exprimer notre respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur J. DORCHE

Nous lui sommes très reconnaissante du grand intérêt qu'il n'a cessé de nous témoigner au cours de nos études et en particulier, lors de la préparation du certificat d'Etudes Supérieures de Pharmacie Industrielle. Nous le remercions de bien vouloir être notre Juge et nous lui exprimons notre profonde gratitude.

Monsieur le Professeur Agrégé M. JOUVET

Nous le remercions sincèrement d'avoir bien voulu s'intéresser à notre travail. Ses conseils judicieux et son aide efficace ont facilité notre tâche. Nous lui en sommes profondément reconnaissante, et nous sommes heureuse de le compter parmi nos Juges.

A NOS MAITRES
DE LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE

A TOUS CEUX QUI ONT CONTRIBUÉ
A L'ÉLABORATION DE CE TRAVAIL, en particulier :

Monsieur F. MICHEL

Monsieur M. KLEIN

Madame C. ALMERAS

Que nous remercions pour l'aide précieuse
qu'ils nous ont apportée.

Nous remercions la Direction de la Société SPECIA
d'avoir bien voulu nous accorder une subvention
pour l'élaboration de ce travail.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE L'ACTION DÉPRESSIVE CENTRALE
DE LA 4-BUTYROLACTONE

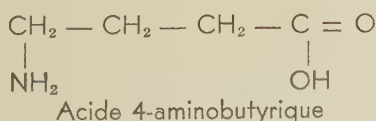
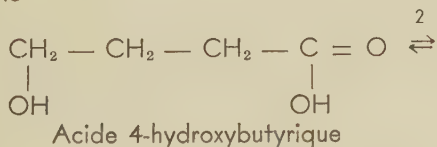
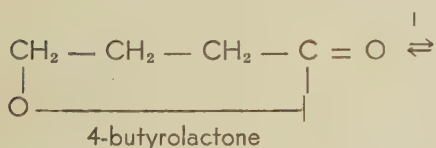
Butyrolactone et carence en pyridoxine
chez le Rat

INTRODUCTION

L'action dépressive centrale de la 4-butyrolactone (BL) a été signalée dès 1947 par RUBIN et GIARMAN (170). Parmi les facteurs chimiques susceptibles de jouer un rôle dans l'activité corticale, il a été démontré que cette lactone et son produit d'hydrolyse, l'acide 4-hydroxybutyrique (HB), ont dans certaines conditions expérimentales, un effet « physiologique », et qu'ils peuvent être considérés comme les précurseurs d'un agent neuro-humoral spécifique capable de déclencher la phase rhombencéphalique du sommeil (PRS) (109). Entre autres hypothèses, l'intervention de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) dans la mise en jeu périodique de la PRS, pourrait être envisagée étant donné le rôle que l'on prête à cet amino-acide dans les inhibitions nerveuses.

Les rapports structuraux existant entre l'acide gamma-aminobutyrique, l'acide 4-hydroxybutyrique et la 4-butyrolactone permettent d'envisager cette dernière comme un précurseur possible du GABA, ce qui implique, au niveau des centres :

- l'existence d'un équilibre entre la lactone et l'acide correspondant (en 1)
- l'intervention d'un processus de transamination (en 2)



A l'appui de cette hypothèse, il n'est peut-être pas inutile de souligner que les sels ammoniacaux potentialisent l'action de la 4-butyrolactone (107-109) et que les réactions de transamination sont très importantes dans le métabolisme des acides aminés. Cette observation nous a conduits à tenter de préciser le rôle qui est dévolu à la vitamine B₆, plus particulièrement au phosphate de pyridoxal, dans un tel processus et nous avons été amenés à envisager l'étude :

— des effets d'une carence en pyridoxine chez le rat, sur le système pontolimbique responsable de la première phase de sommeil ou phase rhombencéphalique.

— des variations du taux d'acide gamma-aminobutyrique dans le cerveau chez l'animal normal et carencé, ainsi que sous l'action de la 4-butyrolactone.

— de l'activité pharmacologique de la 4-butyrolactone chez le rat normal ou carencé en pyridoxine.

Ces recherches qui font l'objet de notre travail expérimental, sont exposées dans la deuxième partie de cette étude ; mais il ne nous a pas paru dénué d'intérêt de présenter, dans une première partie, une mise au point sur la 4-butyrolactone, et de faire le bilan de nos connaissances actuelles sur quelques facteurs chimiques neuro-humoraux afin de situer le problème dans l'état actuel des recherches.

PREMIÈRE PARTIE

GÉNÉRALITÉS

CHAPITRE PREMIER

IMPORTANCE DES FACTEURS CHIMIQUES NEURO-HUMORAUX DANS L'ACTIVITÉ CORTICALE

Le travail qui nous a été proposé, avait pour objet d'étudier le mode d'action de la 4-butyrolactone (BL) au niveau du cortex.

Depuis plusieurs années on sait, en effet, que ce dérivé possède une activité dépressive centrale (170), et dans certaines conditions expérimentales cette activité n'est pas sans rappeler des processus physiologiques (109) dont les mécanismes sont encore discutés mais qui pourraient être liés à la sécrétion neuro-humorale d'un composé inhibiteur spécifique.

Il est hors de propos d'envisager ici l'étude détaillée des facteurs chimiques neuro-humoraux pouvant intervenir éventuellement dans l'activité corticale. Nous nous proposons seulement de situer le problème dans l'état actuel des recherches, en prenant quelques exemples parmi les substances chimiques les plus importantes, susceptibles de jouer un rôle dans les transmissions nerveuses : l'Acétylcholine, les Catecholamines et la 5-hydroxytryptamine, la Substance P et l'acide gamma-aminobutyrique (29-32-46-129-130-198-204).

I. - L'ACÉTYLCHOLINE

A la suite de la découverte du rôle de médiateur chimique joué par l'acétylcholine au niveau des transmissions nerveuses du système nerveux périphérique (SNP), DALE en 1936 (54) émit l'hypothèse suivant laquelle cette substance pourrait jouer un rôle

analogue au niveau de certaines synapses du système nerveux central (SNC). Peu après QUADEL et ses collaborateurs (157), d'une part, et STEDMAN et collaborateurs, d'autre part (183), trouvèrent que des homogénéisats de cerveau pouvaient synthétiser de l'acétylcholine. La répartition de cette substance dans les différentes zones du cerveau, a fait l'objet de nombreux travaux : Mc INTOSH (133), puis FELDBERG et VOGT (70). HEBB et SILVER (91) ont déterminé des zones bien précises du SNC, riches en cholinacétylase, où s'effectue la synthèse de l'acétylcholine. Ces zones correspondent à des aires particulièrement riches en neurones cholinergiques. D'autre part, selon GRAY et WHITTAKER (83) la présence d'acétylcholine dans les fractions d'homogénéisats de cerveau est liée à des structures synaptiques révélées par le microscope électronique.

Le métabolisme de l'acétylcholine est connu actuellement de façon à peu près certaine. Toutefois, la répartition en quantité abondante de l'acétylcholinestérase, dans les différentes parties du SNC, s'explique, semble-t-il, par le rôle de protection qu'elle joue non seulement au niveau des neurones cholinergiques, mais également au niveau des neurones cholinocéptifs, c'est-à-dire sensibles à l'action de l'acétylcholine.

Plusieurs auteurs ont observé des variations du taux d'acétylcholine dans le cerveau, en fonction de l'activité cérébrale. Ainsi des teneurs élevées ont été constatées (CROSSLAND et MERRICK [49]) chez des souris anesthésiées à l'éther ou aux barbituriques. Elles sont d'autant plus importantes que l'anesthésie est plus profonde. Au contraire, pendant les phases de crises convulsives, ce taux d'acétylcholine diminue et il peut descendre à 55 % au-dessous de la concentration normale, mais dès que les convulsions ont cessé, il revient très rapidement à une valeur moyenne (160). La synthèse *in vivo* de l'acétylcholine est donc très rapide et l'équilibre existant entre l'anabolisme et le catabolisme, est déplacé dans un sens ou dans l'autre suivant les changements survenus dans l'activité corticale.

Des injections d'acétylcholine ou d'anticholinestérase par voie générale entraînent des modifications de l'électrocorticogramme ; chez le chat, BRADLEY (31) a obtenu un EEG dont le tracé rappelle celui d'un animal vigilant, avec des vagues rapides, non synchronisées et de bas voltage. Au contraire l'injection d'acétyl-

choline ou d'anticholinestérases dans le ventricule cérébral conduit à un état catatonique. FELDBERG (67) a pensé que certains effets centraux de l'acétylcholine ou des anticholinestérases, seraient dus à une dépolarisation semblable à celle que l'on peut enregistrer dans le SNP. Selon ce dernier auteur, l'acétylcholine serait un médiateur synaptique central ; mais le problème est compliqué par le fait qu'elle n'est pas la seule à jouer ce rôle. On peut penser que le SNC est constitué de neurones cholinergiques qui transmettent les impulsions par libération d'acétylcholine, et de neurones cholinocceptifs qui sont activés par l'acétylcholine, mais il y aurait aussi des neurones non cholinergiques dont les impulsions seraient transmises par l'intermédiaire d'autres substances.

La question est encore loin d'être claire : quelques neurones peuvent être considérés avec certitude comme cholinergiques, mais nous n'avons pas encore, semble-t-il, de preuves formelles d'une transmission cholinergique au niveau de certaines synapses centrales.

L'acétylcholine ne pouvant être considérée comme le médiateur chimique exclusif, de nombreux chercheurs ont entrepris de trouver d'autres substances auxquelles il serait possible d'attribuer de telles propriétés. Ces recherches sont très difficiles car, d'une part il est indispensable de différencier les effets pharmacologiques et physiologiques d'une substance en expérimentation, d'autre part les techniques adoptées pour démontrer une activité neuro-humorale sont en général très indirectes et les résultats, souvent équivoques, sont d'une interprétation difficile.

2. - LES CATÉCHOLAMINES ET LA 5-HYDROXYTRYPTAMINE

Par leur synthèse, leur inactivation, leur localisation, ces substances présentent de nombreux points communs. En outre, les drogues qui modifient les concentrations en catécholamines dans le SNC, agissent souvent de façon semblable sur la 5-hydroxytryptamine (5 HT) ou sérotonine. C'est la raison qui nous a amenés à ne pas les dissocier dans cette étude générale.

La présence d'adrénaline et de nor-adrénaline dans le cerveau a été démontrée pour la première fois en 1946 par EULER (64), et un peu plus tard par HOLTZ (96). C'est en 1954, que AMIN et coll. (3) trouvèrent de la 5 HT dans le cerveau, au cours d'expériences portant sur la substance P.

La synthèse dans le cerveau de la dopamine (précurseur de la noradrénaline) et de la 5 HT est, à l'heure actuelle, définitivement établie. Dans les deux cas, cette synthèse s'effectue par décarboxylation enzymatique d'un amino-acide précurseur capable de franchir la barrière hémato-encéphalique. Il s'agit respectivement de la dihydroxyphénylalanine ou DOPA * (127-179) et du 5-hydroxytryptophane ou 5 HTP (30).

Le métabolisme très complexe des catécholamines a été à peu près complètement élucidé au cours de ces dernières années. Les deux plus importants mécanismes mis en jeu sont la désamination oxydative de la chaîne latérale, par une aminoxydase, et la o-méthylation par une catechol-o-méthyl-transferase. Il semble bien que la désamination oxydative intervienne surtout dans le métabolisme de la dopamine, alors que la o-méthylation est préférentielle au cours du métabolisme de la noradrénaline (6-7). Toutefois CROUT et coll. (50) ont trouvé en 1961, que l'inhibition de la mono-aminoxidase (MAO) provoquait une augmentation du taux de noradrénaline cérébrale alors que celle de la o-méthyl-transferase était sans effet. Plusieurs autres voies métaboliques sont possibles et certaines conduisent à la formation de substances ayant une action pharmacologique, de sorte que la présence de petites quantités de métabolites actifs concentrés en certains points conduirait à une modification de la fonction cérébrale.

En ce qui concerne la 5 HT, son inactivation est essentiellement liée à son oxydation par la MAO.

Comme dans le cas de l'acétylcholine, la large distribution dans le cerveau, de ces enzymes inactivants, s'explique probablement par la fonction qu'ils ont à remplir, c'est-à-dire la protection des récepteurs sensibles à l'action de substances actives circulant ou diffusant dans le milieu. SPECTOR et coll. (180) ont pensé que si ces enzymes sont localisés à l'intérieur même des cellules où

* On a envisagé également comme précurseur de la dopamine la formation de dihydroxy 3-4, phényl-sérine, l'hydroxylation de la chaîne latérale en 1 (fonction alcool secondaire) précédant alors la décarboxylation.

s'effectue la synthèse des amines correspondantes, ils peuvent également servir à maintenir la réserve en amines à un taux normal. L'inhibition de la MAO détruit cet équilibre : lorsque leur catabolisme est bloqué, les amines synthétisées sont probablement stockées jusqu'à saturation des milieux de réserve cellulaires ; à ce stade elles sont alors libérées et responsables des effets pharmacologiques que l'on met à l'actif des inhibiteurs de la MAO tel l'iproniazide.

La répartition dans le cerveau des catécholamines et de la 5 HT, ainsi que de leurs enzymes de synthèse, a été étudiée dès 1957 (24-25-30-38-39-118-192-197) mais aucune conclusion ne peut en être tirée jusqu'ici, sur la ou les fonctions de ces amines. Beaucoup de données sont encore à préciser, notamment les sites électifs des synthèses, les rôles respectifs des différentes catécholamines, données qu'il n'a pas été possible d'établir dans les conditions expérimentales adoptées habituellement, c'est-à-dire *in vitro*.

L'étude de l'action de la noradrénaline et de l'adrénaline dans le SNC a fait l'objet de nombreux travaux et le tableau qui en résulte est encore très confus (169-198). L'interprétation de leurs effets se complique par leurs actions vasculaires, et il s'agit toujours d'expérimentations délicates car de nombreux auteurs ont démontré que ces substances ne franchissent que difficilement la barrière hémato-encéphalique (8-121-158-173).

L'injection intra-veineuse d'adrénaline chez le chat en phase de sommeil mais non anesthésié, provoque l'éveil de l'animal. De larges doses injectées dans une veine ou un ventricule cérébral provoquent le développement progressif en 10 à 15 minutes, d'un état de stupeur. L'injection de 20 à 100 μ g d'adrénaline ou de noradrénaline dans un ventricule latéral, chez le chat, est suivie en quelques minutes d'un effet voisin de l'anesthésie légère, pouvant persister une demi-heure (69). Cependant l'EEG des animaux ainsi traités est désynchronisé, c'est-à-dire semblable à celui d'un animal vigilant (169). Les expériences de DELL et coll. (57) sur le chat curarisé (pour obtenir le silence électrique) ont confirmé ces résultats. Selon ces auteurs l'adrénaline semble également agir sur les réflexes mono- et polysynaptiques qu'elle facilite.

L'étude de l'action de la 5 HT sur le SNC pose des problèmes analogues à ceux que nous avons déjà signalés pour les catécho-

lamines : la 5 HT franchit difficilement la barrière hémato-encéphalique et de fortes doses sont nécessaires pour obtenir un effet sur le SNC ; dans ces conditions, l'action cardio-vasculaire de la sérotonine se surajoute et masque souvent son activité centrale.

Donnée par voie intra-péritonéale à la souris, animal chez lequel elle a des effets tensionnels limités, la 5 HT est sédative. MAR-RAZZI (138) considère qu'elle a une action dépressive sur la transmission synaptique, l'électrocorticogramme étant cependant encore désynchronisé. Toutefois certains auteurs (199) ont trouvé que l'activité électrique était réduite dans certaines aires cérébrales : les noyaux hypothalamique moyen et thalamique.

Appliquée par ionophorèse la 5 HT exerce une action dépressive sur la transmission des impulsions communiquées par stimulation du nerf optique (51). D'autres expériences (58-68) ont montré qu'après injection de sérotonine dans le ventricule latéral du chat, l'animal entre dans un état catatonique caractérisé par un relâchement musculaire sans assoupissement ni état de sommeil.

Nous avons déjà signalé que les catécholamines et la sérotonine franchissent difficilement la barrière hémato-encéphalique, ce qui complique l'étude de leur action au niveau du SNC. Cependant quelques substances qui passent plus aisément dans le milieu cérébral, ont permis par les modifications qu'elles induisent sur les concentrations tissulaires de ces amines, d'acquérir quelques connaissances supplémentaires dans ce domaine.

Ainsi l'administration de DOPA et de 5 HTP est suivie respectivement d'une augmentation de la dopamine (25) et de la 5 HT, associée à une évidente stimulation des centres cérébraux (194). Des résultats analogues ont été obtenus avec les inhibiteurs de la MAO (66-98-178-180) qui élèvent le taux de dopamine, de noradrénaline et de sérotonine. Nous ne pouvons entrer, ici, dans les détails de cette étude sur les inhibiteurs de la MAO, sujet très vaste, qui a déjà fait l'objet d'une abondante littérature. Nous nous bornerons à signaler que ces substances, dont le nombre est considérable, et qui sont actuellement utilisées en psychiatrie et en cardiologie, exercent également une action sur d'autres systèmes enzymatiques. Il est donc encore impossible de préciser si les changements neurologiques observés après leur administration, sont dus uniquement à l'inhibition d'amines auxquelles on attribue une action dépressive sur le SNC.

Parmi d'autres substances étudiées qui modifient les concentrations cérébrales en catécholamines et sérotonine, citons les inhibiteurs de la dopa- et de la 5 HT-décarboxylase. Ainsi l' α -méthyl-dopa abaisse les concentrations en dopamine, noradrénaline et 5 HT dans le cerveau des animaux en expérience. Mais une inhibition de la décarboxylase est-elle seule mise en cause? (92) SMITH (177) a relevé une nette action sédative chez la souris mais on ne peut encore affirmer si elle est entièrement liée à une chute du taux cérébral des amines étudiées.

La réserpine et d'autres alcaloïdes des *Rauwolfia*, ainsi que certains dérivés de synthèse, administrés à l'animal, libèrent les catécholamines et la 5 HT à partir de leurs réserves cellulaires et entraînent une diminution sensible de leur concentration dans le cerveau (35-38-97-154-175). Outre les effets périphériques de cette libération, ces composés exercent une nette action sédative.

Pouvons-nous, à la lumière des résultats obtenus à l'heure actuelle, tirer une conclusion sur les rôles respectifs que jouent les catécholamines et la sérotonine dans l'activité corticale? La noradrénaline peut-elle remplir la même fonction de médiateur synaptique dans le SNC et dans le SNP? Nous avons déjà signalé que certains neurones du SNC peuvent être classés comme cholinergiques, mais l'identification de neurones adrénergiques n'est pas encore faite. Si certaines parties du cerveau sont très riches en noradrénaline, cette substance s'y trouve associée à la dopamine et à la sérotonine qui semblent être aussi facilement libérées et inactivées. Il est donc encore impossible de définir le rôle exact de chacune de ces amines, sous leur forme liée ou libre, dans l'activité corticale. On en est réduit à des hypothèses dont certaines méritent cependant d'être citées :

— BRODIE et ses collaborateurs (33-36) confèrent à la 5 HT le rôle d'un médiateur chimique des centres parasympathiques et l'opposent à la noradrénaline, neuro-hormone des centres sympathiques.

— MARRAZZI (137) oppose les effets de la 5 HT et des amines catéchiques à ceux de l'acétylcholine dans la transmission synaptique du cortex optique du chat excité par la voie « trans-calleuse ». Il admet que la transmission des synapses centraux est sous le double contrôle de l'excitation cholinergique et de l'inh-

bition adrénergique. La sérotonine, puissant inhibiteur de cette transmission, s'opposerait, aux mêmes doses, aux effets excitants de l'acétylcholine et jouerait un rôle important dans l'équilibre mental (138-139-204).

3. - SUBSTANCE P

La substance P est un polypeptide, de composition inconnue, isolé pour la première fois dans l'intestin et le cerveau, par EULER et GADDUM, en 1931 (65). L'étude de sa répartition dans les différentes régions du cerveau a été faite par AMIN et ses collaborateurs en 1954 (3). L'intérêt que suscite cette substance à l'heure actuelle est dû à l'action qu'on lui prête, sur le SNC. ZETLER (205) a démontré qu'une injection sous-cutanée à la souris, est suivie d'une diminution très nette de l'activité spontanée. Cette substance potentialise les effets des hypnotiques et antagonise les effets convulsivants de la strychnine et de la picrotoxine. On observe d'ailleurs des modifications de l'EEG après son injection intra-artérielle, effets qui semblent liés à une stimulation d'un système activant (128). Jusqu'ici cependant, l'étude des propriétés pharmacologiques de la substance P, n'a pas permis de savoir si elle joue un rôle direct au niveau des neurones corticaux.

4. - L'ACIDE GAMMA-AMINOBUTYRIQUE

L'acide gamma-aminobutyrique ou GABA est connu depuis longtemps en tant qu'acide aminé. On a découvert son existence en 1910 (1) dans de nombreux organismes vivants, bactéries et végétaux, mais il n'a fait cependant l'objet d'aucune recherche particulière jusque vers 1950 lorsque ROBERTS (164) et AWAPARA (5) ont signalé sa présence chez les mammifères et sa localisation presque exclusive dans le SNC. Il s'est révélé être en effet le plus abondant des acides aminés libres extractibles du tissu cérébral, et sa localisation spécifique dans le SNC a aussitôt attiré l'attention des neurophysiologistes.

Les études consacrées au métabolisme biochimique et au rôle physiologique du GABA, ont pris une importance accrue à la suite de la découverte par FLOREY, en 1953 (72), du Facteur I

dans les extraits de cerveau de Mammifères * et de son action inhibitrice corticale, tout au moins dans des conditions expérimentales particulières.

Une littérature abondante a été consacrée au GABA depuis 1950. Sa présence dans le SNC a été démontrée, soit par des méthodes biologiques basées sur son action sur le tensio-récepteur des crustacés, soit par des méthodes chimiques utilisant la chromatographie.

Le GABA est localisé essentiellement dans la matière grise, dans les neurones et particulièrement au niveau des mitochondries (23-187).

Il semble exister dans le cerveau en partie sous une forme libre, et en partie sous une forme dissimulée (61). D'après UDENFRIEND et ses collaborateurs (193), cette dernière serait la γ -amino-butryl-histidine. Pour ELLIOT (60) la rétention et la libération du GABA seraient des processus actifs effectués au niveau de certains organites cellulaires, ces échanges nécessitant, comme pour un transport actif, de l'énergie métabolique et une structure spéciale.

Comme la plupart des substances à action corticale que nous venons d'étudier, le GABA ne passe pas la barrière hémato-encéphalique (189). Il est synthétisé à partir de l'acide glutamique par action d'une décarboxylase spécifique, la décarboxylase glutamique ou GAD, enzyme localisé comme le GABA, uniquement dans la substance grise du SNC (2-16). Le GABA ainsi formé, est métabolisé par un autre enzyme la GABA-transaminase (GABA-T) qui catalyse la réaction de transamination entre le GABA et l'acide α -cétoglutarique, réaction qui aboutit à la régénération de l'acide glutamique et à la formation de semi-aldéhyde succinique. Ces réactions qui dépendent de la présence de phosphate de pyridoxal, peuvent être plus ou moins perturbées par une carence en co-enzyme. Une oxydation irréversible du semi-aldéhyde succinique en succinate (161), couplée à des phosphorylations oxydatives (134) dans lesquelles intervient le DPN, permet de relier le GABA au cycle tricarboxylique de KREBS (162).

* Cette question est développée par ailleurs : elle fait l'objet de notre second sujet de thèse.

D'autres voies métaboliques ont été proposées pour le GABA ; mentionnées dans le schéma ci-joint (fig. 1), elles seront discutées plus loin.

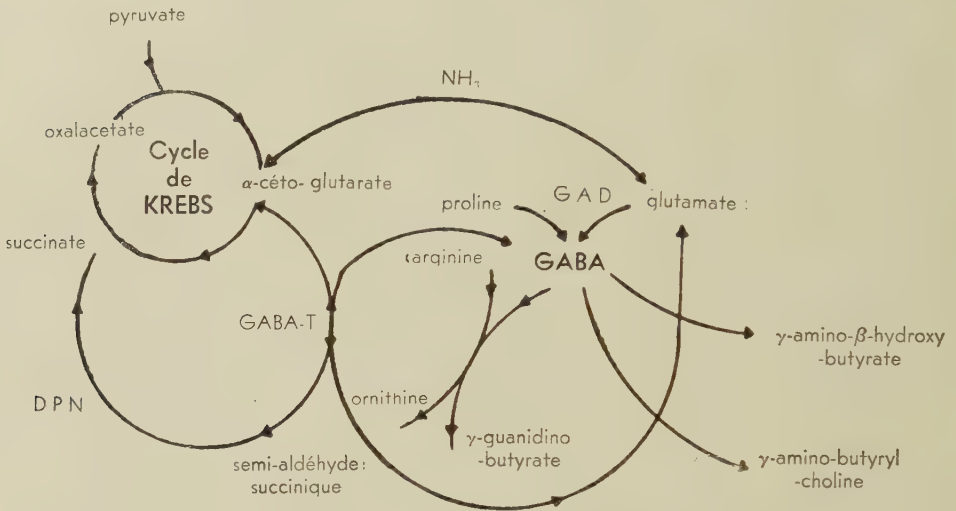


Fig. 1. — Métabolisme de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA)

La localisation spécifique du GABA dans la matière grise du SNC permet de penser qu'il intervient directement ou indirectement dans son fonctionnement.

De nombreux auteurs ont étudié le rôle du GABA dans les convulsions. Dans la plupart des cas le déclenchement ou la suppression des convulsions correspond à une baisse ou à une augmentation de son taux cérébral (14-56-60-112-113-114-162-196). Cependant les relations de cause à effet sont encore très discutées (12-22-141).

Deux hypothèses ont été émises pour expliquer le rôle physiologique du GABA dans le SNC (95) :

1) Le GABA intervient dans la régulation du métabolisme oxydatif du SNC par l'intermédiaire du cycle tricarboxylique de KREBS (134-188).

2) Le GABA peut être considéré comme une substance inhibitrice plus ou moins spécifique du SNC, soit qu'il active les neurones inhibiteurs, soit qu'il inhibe les neurones d'excitation. Les

expériences sur le tensio-récepteur des Crustacées (74-99-117-136) sont à l'origine de cette hypothèse et ont suscité l'intérêt des électrophysiologistes. Les publications consacrées à ce sujet sont nombreuses (62-90-104-117-135-155).

Les expériences de CURTIS et ses coll. (52-53) par application ionophorétique, ont montré que le GABA avait une action dépressive non spécifique sur toutes les réponses neuronales et ces résultats ont été confirmés par BINDMAN (27) par applications topicales. Une action post-synaptique du GABA le disqualifierait donc en tant que médiateur chimique des neurones inhibiteurs. Ce point de vue est également partagé par FLOREY (73) et par GOLDRING et O'LEARY (80). Les électrophysiologistes semblent donc considérer que le GABA agit en augmentant la conductance de la membrane neuronale peut-être aux ions Cl^- , ce qui expliquerait ses actions inhibitrices variées en l'absence de changement du potentiel de membrane (27-52-53). Leur interprétation rejoint ainsi celle de TOWER (187-188) qui a cru pouvoir relier l'activité neuronale du GABA, aux variations du métabolisme oxydatif et de la perméabilité cellulaire.

En fait les deux hypothèses ne s'excluent pas mutuellement ; jusqu'ici les données expérimentales sont encore fragmentaires : biochimistes et neurophysiologistes ne peuvent répondre pour l'instant à toutes les questions posées par les rôles métabolique et neuro-humoral possibles du GABA.

Il est un point important à souligner par ailleurs : si le métabolisme oxydatif par la voie du cycle tricarboxylique de KREBS est bien admis aujourd'hui, de nombreuses autres filiations ont été proposées (fig. 1). On sait d'une part que le GABA peut être synthétisé, comme l'ont montré SPORN et ses coll. (181) à partir de la proline, par une réaction oxydative qui est aussi réalisée in vitro, par processus radicalaire, dans des conditions biologiques (147). On sait d'autre part que cet amino-acide est également impliqué dans une transamidation avec l'arginine pour former de l'acide gamma-guanidinobutyrique (101-152-153) ; la formation d'acide gamma-amino-béta-hydroxybutyrique (GABOB) (100) et de gamma-aminobutyryl-choline (119) a été enfin envisagée : ces substances ont des propriétés pharmacologiques semblables à celles du GABA, notamment son action inhibitrice sur le tensio-récepteur des crustacés ; d'après certains auteurs les effets neurophysiologiques attribués au GABA lui-même ne pourraient-ils

pas être dus à certains de ces dérivés? Selon HAYASHI (89) l'action protectrice du GABOB contre les convulsions serait vingt fois plus puissante que celle du GABA. Ce point de vue est maintenu également par PURPURA et ses coll. (155). Par ailleurs un certain nombre d'acides aliphatiques ω -aminés ont une activité synaptique notable (156). Ceux qui ont une chaîne de 2 à 5 atomes de carbone possèdent une action inhibitrice semblable à celle du GABA mais plus faible, tandis que les composés en C_6 et C_8 ont une action excitatrice pouvant entraîner l'apparition de convulsions dans les conditions expérimentales (acide ω -aminocaprylique (85-156). La position des dérivés en C_4 paraît donc privilégiée dans l'inhibition de l'activité corticale et ces dernières années deux nouvelles substances ont suscité l'intérêt des neuro-physiologistes : la 4-butyrolactone (BL) et l'acide 4-hydroxybutyrique (4 HB) qui en dérive par hydratation.

Bien avant l'étude, par LABORIT et son équipe (123), de l'activité inhibitrice du 4-HB, chez l'animal et chez l'Homme, l'action dépressive de la BL avait été observée par RUBIN et GIARMAN (170). Cette propriété a été confirmée depuis par BENDA et PERLES (19) et JOUANY et coll. (107) ; plus récemment les travaux de JOUVET et coll. ont révélé le rôle important que pourrait jouer cette lactone au cours de certaines phases physiologiques du sommeil (109).

5. - BUTYROLACTONE ET SOMMEIL PHYSIOLOGIQUE

Le problème du sommeil est complexe et a soulevé de nombreuses hypothèses opposées. Il est généralement admis à l'heure actuelle qu'il existe deux états différents de sommeil au point de vue EEG et comportemental, chez l'animal normal (mammifères).

— le sommeil lent caractérisé par la présence de fuseaux et d'ondes lentes corticales et sous-corticales et résultant de la mise en jeu d'une activité inhibitrice corticofuge.

— le sommeil rapide ou phase rhombencéphalique du sommeil (PRS) où prédomine une activité rapide corticale (108-110-143). Cette phase dépend d'un système pontolimbique dont la mise en

jeu périodique évoque un mécanisme neuro-humoral. En effet, de nombreux faits expérimentaux sont en faveur de l'existence d'un processus actif. On peut en particulier déclencher des PRS par stimulation du tronc cérébral. Ce résultat expérimental soulève de nombreux problèmes. Les PRS provoquées durent plus longtemps que le stimulus initial, ce qui paraît traduire un mécanisme d'enclenchement. Il ne peut être question de phénomènes purement neuroniques, car les inhibitions nerveuses ne persistent pas plus longtemps que la stimulation. Enfin l'apparition des PRS semble obéir à un rythme relativement strict. Il existe en effet une phase réfractaire absolue, de l'ordre de 5 à 10 minutes, chez l'animal intact et de 10 à 15 minutes chez l'animal décortiqué ou décérébré, au cours de laquelle les stimulations nerveuses sont inefficaces. La durée d'une telle phase réfractaire est inexplicable si la PRS dépend de phénomènes purement neuroniques. C'est pourquoi l'hypothèse d'un mécanisme neuro-humoral peut légitimement être invoqué (108).

L'action hypnogène de la BL et du HB (sous forme de sel de Na) a incité JOUVET et ses coll. à étudier leurs effets sur les deux phases de sommeil, chez le chat, grâce à des préparations chroniques spécialement choisies pour analyser une telle action. Les résultats expérimentaux permettent de dissocier deux modalités d'action de ces drogues : d'une part, une action corticale de type pharmacologique, qui persiste longtemps et qui est responsable chez l'animal intact, d'un comportement plus ou moins sévère de narcose, réversible pendant de courts instants lors de stimulations sensorielles accompagnées d'une activité EEG associant ondes lentes et signes irritatifs. A cet effet cortical, s'oppose celui sur le tronc cérébral plus précoce et plus fugitif. Une telle action semble intéressante car elle peut déclencher la PRS, phénomène physiologique, chez l'animal normal, avec de faibles doses, et surtout chez l'animal décortiqué chez lequel l'action narcotique corticale ne peut plus s'exercer. Dans ce cas, il semblerait que la BL soit le précurseur direct ou non de l'agent neuro-humoral spécifique capable de déclencher la PRS par action au niveau du tronc. Entre autres hypothèses, il a été naturellement envisagé l'intervention de l'acide gamma-aminobutyrique dans la mise en jeu périodique de cette phase de sommeil, en raison du rôle qu'on prête à cet amino-acide dans les inhibitions nerveuses (42).

Nous avons essayé dans ce chapitre, de définir l'importance de certains facteurs chimiques neuro-humoraux doués d'une action centrale.

La position de chacun est encore incertaine et malgré l'abondante littérature qui leur est consacrée, leur étude conduit à un tableau complexe. Les chercheurs se heurtent souvent à de nombreuses difficultés inhérentes aux méthodes d'expérimentation :

— Les effets physiologiques des substances étudiées sont parfois masqués par des effets pharmacologiques.

— La complexité du SNC rend difficile l'emploi de méthodes expérimentales directes et les méthodes indirectes conduisent souvent à des résultats dont l'interprétation est très délicate.

Néanmoins, si le rôle des substances que nous avons étudiées, n'est pas toujours très clair, leur importance dans l'activité du SNC paraît évidente.

— Comme dans le SNP, l'acétylcholine joue probablement le rôle de médiateur chimique au niveau des neurones cholinergiques.

— Les catécholamines et la sérotonine ont une place qui paraît beaucoup moins bien définie, en dépit des quantités considérables de ces amines, détectées dans certaines zones du cerveau.

— Quant à l'acide gamma-aminobutyrique, est-il l'agent neuro-humoral responsable de la phase rhombo-encéphalique du sommeil? La butyrolactone en est-elle le précurseur?

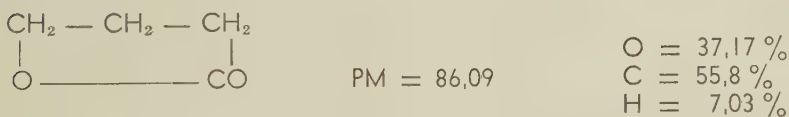
C'est là une des questions que nous nous sommes posés. Nos résultats ne nous permettent sans doute pas d'apporter une réponse définitive, mais pour autant ils n'affectent en rien l'intérêt que présente cette lactone en neurophysiologie.

CHAPITRE II

LA 4-BUTYROLACTONE

I. - SYNTHÈSE ET PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES (84)

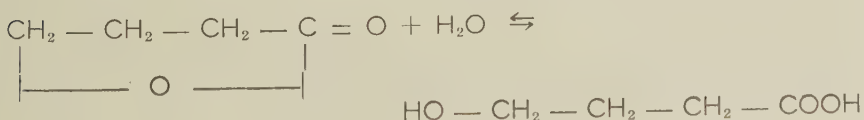
La 4-butyrolactone (BL) : $C_4 H_6 O_2$, qui répond à la formule développée suivante :



est le premier olide qui ait été obtenu en 1873 par SAYTZEFE.

1) Synthèse.

Sa formation à partir de l'acide 4-hydroxybutyrique (HB) est particulièrement facile. Elle a lieu dès la température ordinaire et augmente avec la température ; on obtient la butyrolactone, avec un rendement acceptable, par distillation sèche de l'hydroxycide. La cyclisation s'effectue également en solution aqueuse ; ici encore la vitesse de lactonisation augmente avec la température ainsi qu'avec la concentration de la solution en ions H^+ . Mais elle n'est jamais complète dans ces conditions : on arrive à un équilibre fortement orienté du côté de la lactone.



Produit industriel, la BL est préparée par tonnes à l'aide de différentes techniques : nous citerons entre autres sa synthèse malonique qui consiste à faire réagir l'oxyde d'éthylène sur le malonate d'éthyle sodé (106), la condensation de l'ester chloro-éthylvinyle avec le malonate d'éthyle sodé, sa préparation à partir d'acétylène et de formaldéhyde (84) *.

2) Propriétés physiques.

C'est un liquide huileux, d'odeur éthérée caractéristique.

$$Eb_{760} = 206^{\circ} C \quad F = -44^{\circ} C \quad d = 1,1286$$

Elle est miscible à l'eau en toutes proportions et ses solutions aqueuses présentent une très légère réaction acide. Elle est entraînable par la vapeur d'eau et distille sans décomposition, sous pression réduite. Elle est soluble dans le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'éther, le benzène...

Son spectre I.R. permet de l'identifier et de la différencier des acides buténoïques isomères, l'acide vinyl-acétique, les acides crotoniques et isocrotoniques, enfin l'acide α -méthyl-acrylique.

3) Propriétés chimiques.

L'hydrolyse de la BL en solution aqueuse est très lente à température ordinaire. La transformation s'accélère quand la température s'élève, mais reste toujours incomplète. Cette hydrolyse est catalysée par la présence d'un acide minéral et sa vitesse est proportionnelle à la concentration en ions H^+ de la solution. Mais on arrive toujours à un équilibre, le même équilibre, qu'on parte de la γ -lactone ou de l'hydroxacide. Si l'hydrolyse est rapide à des pH nettement acides ou alcalins, il a été démontré que dans les conditions de pH et de température physiologiques (pH 7,3 à $37^{\circ} C$) la 4-butyrolactone ne peut être hydrolysée spontanément, si ce n'est à une vitesse très lente.

* N.B. : La 4-butyrolactone intervient comme intermédiaire dans la synthèse de la polyvinylpyrrolidone, la DL-méthionine, la piperidine, l'acide phénylbutyrique, les acides thio-butériques.

Enfin, c'est un solvant pour le polyacrylonitrile, l'acétate de cellulose, les polymères du méthyl-métacrylate, le polystyrène et un diluant des peintures (The Merck Index 7 th Ed. p. 186).

La BL donne un certain nombre de réactions chimiques communes à toutes les lactones :

— les hydracides la transforment en acide butyrique γ -halogéné.

— les agents puissants d'halogénéation, tels que PCl_5 , agissent en donnant par exemple du chlorure d'acide butyrique γ -chloré.

— l'oxydation par l'acide chromique donne de l'acide succinique.

— la réduction par l'acide iodhydrique en présence de phosphore rouge à $220^\circ - 250^\circ$ aboutit à l'acide butyrique. En présence de sodium et d'alcool éthylique absolu on obtient le glycol correspondant et si l'agent de réduction est l'amalgame de sodium, le groupe carbonyle se réduit en aldéhyde de sorte que l'on est en présence d'un aldéhyde-alcool. Cette réaction est d'une grande importance dans la chimie des sucres.

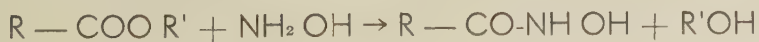
— L'éthylate de sodium permet la condensation de deux molécules de BL sans ouverture du cycle lactonique. Sous son influence la BL peut également donner des produits de condensation avec les aldéhydes et les cétones.

— Enfin, par chauffage plus ou moins prolongé au bain-marie en présence d'hydrazine (sous forme d'hydrate), la BL peut donner naissance, par fixation de l'hydrazine sur le groupement carbonyle, à une hydrazino-lactone, corps bien cristallisé qui permet d'identifier et même de doser la lactone dans des mélanges complexes.

2. - DOSAGE DANS L'ORGANISME

Etant donné l'intérêt que suscitent la butyrolactone et son produit d'hydrolyse, l'acide 4-hydroxybutyrique, en neuro-pharmacologie, plusieurs auteurs se sont attachés à l'étude biochimique de ces substances et ont proposé des techniques de dosage en milieu biologique.

En 1964, FISHBEIN et BESSMAN (71) proposent une technique de dosage dans le cerveau qui est une adaptation de celle de HESTRIN (93) pour le dosage des esters sous forme d'hydroxamates.



Cette réaction est applicable aux esters internes que sont les lactones. Dans les conditions expérimentales adoptées par les auteurs, il est possible de doser séparément la 4-butyrolactoné et la somme butyrolactone — acide 4-hydroxybutyrique :

— sur une prise d'essai, la BL est seule extraite par l'oxyde d'éthyle à pH 1.

— Une seconde prise d'essai est alcalinisée à pH 12 de façon à hydrolyser les esters et les olides présents dans le milieu. Une nouvelle acidification à pH 1 conduit à la lactonisation spécifique de l'acide 4-hydroxybutyrique libéré. La BL extraite après ce traitement représente donc la somme des deux composés en C_4 .

L'acide hydroxamique formé est isolé par chromatographie sur papier (182) ; les spots sont révélés par un réactif au chlorure ferrique et la colorimétrie est effectuée à $540\text{ m}\mu$ après élution.

Par cette technique de dosage les auteurs ont mis en évidence la présence de 4-butyrolactone et d'acide 4-hydroxybutyrique dans le cerveau de rat adulte ; leur somme représenterait une concentration de 2×10^{-3} Moles/kg de tissu frais. Ces substances pourraient donc être considérées comme des métabolites normaux dans le cerveau de mammifères et se formeraient (26) par réduction du semi-aldéhyde succinique (cette réaction serait catalysée par une isozyme de la déhydrogénase lactique) *.

Récemment GIARMAN et ROTH (77) ont mis au point avec l'aide de LIPSKY, une technique de dosage spécifique de l'acide 4-hydroxybutyrique et de la 4-butyrolactone, par chromatographie en phase gazeuse. Utilisant un appareil à ionisation de flamme, les auteurs ont pu caractériser et doser des quantités de ces deux composés, à des concentrations très faibles (jusqu'à 10^{-6} Moles/kg).

En dépit de sa sensibilité cette technique ne leur a permis de retrouver ni la butyrolactone ni l'acide 4-hydroxybutyrique dans les extraits de cerveau et le sang des mammifères (rats, lapins, chats et chiens), ce qui est en contradiction avec les conclusions des travaux de BESSMAN et de ses coll. (26-71).

* N.B. : Cette idée n'est d'ailleurs pas nouvelle puisque une déhydrogénase spécifique du semi-aldéhyde succinique, a été isolée d'un matériel bactériologique par HARDMAN et STADTMAN (88) au cours d'une étude portant sur le métabolisme du GABA par *Clostridium aminobutyricum* : les auteurs ont démontré qu'il s'établit un équilibre d'oxydo-réduction entre le semi-addéhyde succinique et l'acide 4-hydroxybutyrique.

3. - TOXICITÉ

Irritante pour les yeux et les muqueuses, la BL a une toxicité relativement faible, liée à une dépression ventilatoire (109). Sa DL 50 chez le Rat est de 800 mg/kg par voie intra-péritonéale (19). LABORIT considère que le 4-hydroxybutyrate de sodium est beaucoup moins toxique. Sa dose létale 50 chez la souris est :

- par voie intra-péritonéale : 1,94 g/kg
- par voie orale : 4,28 g/kg.

Cette toxicité est également liée à une atteinte de la respiration (120). Cependant compte tenu des poids moléculaires de ces deux substances et de l'action plus rapide et plus profonde de la 4-butyrolactone, il semble que les toxicités aiguës de la lactone et de l'acide-alcool dont elle dérive, soient sensiblement voisines.

4. - PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES DE LA BL

1. - Action dépressive centrale.

Contrastant avec l'abondance de la littérature chimique ayant traité à la BL, il n'existe que peu de travaux d'ordre physiologique.

— Son action dépressive centrale fut observée pour la première fois en 1947 par RUBIN et GIARMAN (170) au cours d'une étude sur l'activité chimio-thérapique de différentes lactones. Ils observèrent que les souris traitées à la BL se comportaient comme des animaux sous anesthésie. Plus tard GIARMAN démontra que la BL agissait sur le chat par une complète abolition de l'activité électrique au niveau du néocortex (76).

En 1960, BENDA et PERLES (19), ont confirmé cette action dépressive de la BL par des expériences sur le rat, le pigeon et le lapin.

L'étude du comportement de ces animaux comprend l'observation des fluctuations de la vigilance et de sa composante tonique.

a) Chez le rat, 10 minutes après l'injection intra-péritonéale de 300 à 700 mg/kg de BL *, l'activité spontanée s'appauvrit progressivement. Placé sur les parois latérales de la cage, l'animal manifeste une difficulté croissante à les explorer. Bientôt il demeure agrippé, conservant la même attitude et finit par lâcher prise ; on suit parallèlement la réponse au test de la traction et les variations du tonus musculaire. Peu à peu se précise la lenteur puis la disparition d'un réflexe de posture, comme le réflexe de redressement.

Le sommeil se prolonge ainsi pendant quelques heures. Dans les cas typiques, il est possible d'éveiller l'animal de façon fugace par un stimulus brusque, tactile ou auditif, mais il se rendort dans les secondes qui suivent l'arrêt de l'incitation.

b) Chez le pigeon, l'injection intra-musculaire de 300 à 600 mg/kg de BL est suivie d'effets particulièrement rapides (1 à 3 minutes après l'injection). Les modifications du tonus sont évidentes et l'animal ne peut plus voler, puis progressivement vacille et se couche. Bientôt il n'arrive plus à tenir son bec qui vient à tomber et reste piqué à terre, enfin le cou et la tête se replient complètement sur le sol. Cet effet dure 1 à 2 heures.

c) Chez le lapin, enfin, la dose active est voisine de 500 mg/kg par voie intra-veineuse. L'effet n'est pas immédiat mais se traduit, après quelques minutes, comme précédemment, par un abaissement de la vigilance et une perte de tonus musculaire.

— Au cours d'une expérimentation clinique de la BL, BENDA et coll. (18) ont étudié les effets de cette lactone sur le comportement de l'Homme et également sur le tracé EEG. Le sommeil survient dans presque tous les cas, après injection intra-veineuse de BL à la dose de 20 mg/kg environ. Cependant le tracé EEG observé se différencie du sommeil physiologique et du sommeil barbiturique, notamment par l'absence de rythmes rapides et la fréquence bien moindre de pointes au vertex et de spindles. La tendance à la rythmicité lente témoignerait d'un seuil convulsif abaissé.

* N.B. : Ces doses sont très proches des doses toxiques. Nous avons utilisé, au cours de nos expériences, des doses beaucoup plus faibles (200 mg/kg de poids vif, par voie intra-péritonéale) qui nous ont également permis de mettre en évidence l'action dépressive très marquée de la Butyrolactone chez le rat.

— Cette étude a été reprise de façon plus précise sur le chat (109).

A. - Chez l'animal normal

a) Des doses de 200 à 500 mg/kg se traduisent au point de vue comportemental, par une narcose totale ; la diminution du tonus musculaire est complète, les yeux restent ouverts, les membranes nictitantes ne se relâchent pas, le myosis est incomplet, il n'y a pas de réflexe cornéen, l'animal ne réagit pas aux stimulations nociceptives. Les rythmes cardiaque et respiratoire se ralentissent.

Le tracé EEG ne révèle à aucun moment l'apparition de PRS. On peut observer une dissociation nette entre la réactivité EEG et comportementale. Enfin une salivation importante a souvent été notée.

b) A des doses plus faibles (50 à 100 mg/kg), après une phase d'assoupissement de 5 à 15 mn caractérisée par des zones lentes corticales, apparaissent des PRS typiques au point de vue EEG (activité rapide corticale, activité rythmique rhinencéphalique, fuseaux pontiques) et comportemental (mouvements oculaires et mouvements saccadés des vibrisses, disparition de l'EMG de la nuque, etc...)

Cette PRS, d'une durée moyenne de 5 à 10 mn, fait place à un état de « sommeil lent » qui ne peut cependant être assimilé au sommeil physiologique au point de vue EEG. Ce stade persiste pendant une heure environ et l'animal paraît dormir ; cependant ses yeux sont rarement clos et ses pupilles sont souvent en mydriase. Enfin, les stimulations auditives peuvent entraîner un éveil comportemental sans qu'il apparaisse d'« activation » corticale durable.

B. - Par des expériences

a) Sur l'animal décortiqué

b) Après coagulation du noyau RPC

les auteurs sont parvenus à dissocier les deux modalités d'action de la BL dont nous avons fait mention dans le chapitre précédent.

- action pharmacologique, décrite ci-dessus, à fortes doses
- action « physiologique » permettant de considérer la BL comme un précurseur possible d'un agent neuro-humoral capable de déclencher la PRS.

On ne connaît pas encore la nature chimique de cet inducteur éventuel des phases rapides de sommeil ni, évidemment, des processus le reliant à la butyrolactone.

On sait simplement que les effets hypnogènes de la BL sont potentialisés par plusieurs dérivés ammoniogénétiques :

ammoniaque, chlorure d'ammonium, asparagine (107-109).

2. - Action hypnogène comparée de la butyrolactone et de quelques dérivés ou analogues structuraux.

a) Dérivés α -halogénés (150)

— L' α -chlorobutyrolactone possède à la fois une activité hypnogène et un index thérapeutique comparable à ceux de la BL.

— L'activité de l' α -dichlorobutyrolactone est nettement inférieure chez le pigeon et nulle chez le rat.

— Le dérivé α -bromé est inactif et particulièrement toxique.

b) Pantolactones (α -hydroxy, $\beta\beta$ -diméthyl, γ -butyrolactone) (20)

La D-pantolactone ainsi que la forme racémique DL ont des effets convulsivants.

c) γ -valérolactone et alcool tétrahydrofurfurylique (19)

Ces corps employés à des doses comparables à celles de la BL, n'apportent aucune modification de la vigilance chez le rat et le pigeon.

Ces données expérimentales rendent compte d'une certaine spécificité d'action de la butyrolactone et non de la fonction lactonique. Elles ont été confirmées ici même (M. JOUVET et coll., résultats non publiés). Les activités centrales de la propiolactone, de la γ -valérolactone et de la butyrolactone ont été comparées : les deux premières se sont avérées douées de propriétés convulsi-

vantes, mises en évidence à l'EEG, seule la butyrolactone a présenté une action dépressive centrale et s'est révélée capable d'induire les phases rhomboencéphaliques du sommeil.

3. - Action dépressive comparée de la 4-Butyrolactone et du 4-hydroxybutyrate de sodium.

L'action centrale inhibitrice du 4-hydroxybutyrate de sodium a été signalée par LABORIT et son équipe en 1960 (123). L'intérêt suscité par cet acide réside dans son emploi clinique en anesthésiologie et en neuropsychiatrie et une littérature abondante a été publiée à ce sujet (122-124-125-126-171).

L'étude comparée des effets pharmacologiques de la BL et du HB, soit sur l'EEG, soit sur le comportement de différents animaux, a fait l'objet de plusieurs expériences (19-107-109).

Les auteurs sont d'accord pour affirmer que l'action des deux drogues est comparable au point de vue de leurs effets sur l'EEG et le comportement. La différence entre ces deux produits repose surtout sur la rapidité d'action plus grande de la butyrolactone. Elle agit de façon plus constante et à de moindres doses (19-109).

Effets secondaires :

Les effets secondaires de la 4-butyrolactone sur l'organisme ont été peu étudiés jusqu'à présent. D'après les premiers essais en clinique effectués par BENDA et coll. (18), il semble que sa tolérance soit bonne aux doses thérapeutiques (soit chez l'Homme 15 à 20 mg/kg par voie intraveineuse)
20 à 30 mg/kg par voie intramusculaire ou orale).

Cependant d'autres expérimentateurs n'ont pas observé une tolérance aussi bonne aux doses préconisées. L'atteinte respiratoire se manifeste parfois dès les doses thérapeutiques (123).

On connaît beaucoup mieux à l'heure actuelle les effets secondaires du 4-hydroxybutyrate de sodium utilisé chez l'animal, ainsi que chez l'Homme au cours de l'emploi clinique de ce produit en anesthésiologie et en neuropsychiatrie (20-124-125-126-150-171).

Ces effets se résument par :

- une bradypnée avec augmentation de l'amplitude respiratoire
- une action hypothermisante très nette
- une hypokaliémie importante et une hypernatrémie sans modification de l'équilibre acido-basique (pH - RA).
- Mentionnons enfin la potentialisation des anesthésiques tels que le penthiobarbital.

La discussion est encore ouverte sur les mérites respectifs de la 4-butyrolactone et de l'acide 4-hydroxybutyrique.

Les travaux récents de BESSMAN et SKOLNIK (26) et de GIARMAN et ROTH (77) sur leur métabolisme ont abouti à des résultats contradictoires. En effet, étant donné l'équilibre existant in vitro en solution aqueuse entre la lactone et l'acide 4-hydroxybutyrique, ces auteurs ont essayé de déterminer si les propriétés narcotiques de ces deux substances étaient liées de façon plus spécifique à la lactone ou à l'acide-alcool.

Dans ce but, BESSMAN et SKOLNIK (26) ont suivi les variations de concentration dans différents tissus (cerveau, sang, foie, rein, muscles) de la 4-butyrolactone et de l'acide 4-hydroxybutyrique, au cours de la narcose provoquée par l'injection chez le rat, de l'un ou l'autre de ces composés (injection intra péritonéale à raison de 5,8 mEq/kg de poids vif) :

a) 5 à 10 minutes après l'administration de l'acide 4-hydroxybutyrique (sous forme de sel de sodium) les animaux tombent dans un état de narcose qui dure environ 1 h 45 mn. Les dosages de l'acide 4-hydroxybutyrique effectués selon la technique de FISHBEIN et BESSMAN (71), mettent en évidence une concentration maximale dans le cerveau 2 heures après l'injection, alors que les rats sont déjà sortis de leur état catatonique (fig. 2).

Par contre le dosage de la 4-butyrolactone dans les mêmes conditions après administration de 4-hydroxybutyrate de sodium, met en évidence une concentration maximale dans le cerveau une heure après l'injection, c'est-à-dire pendant la phase de narcose. Cette concentration diminue rapidement pendant la deuxième heure (fig. 3).

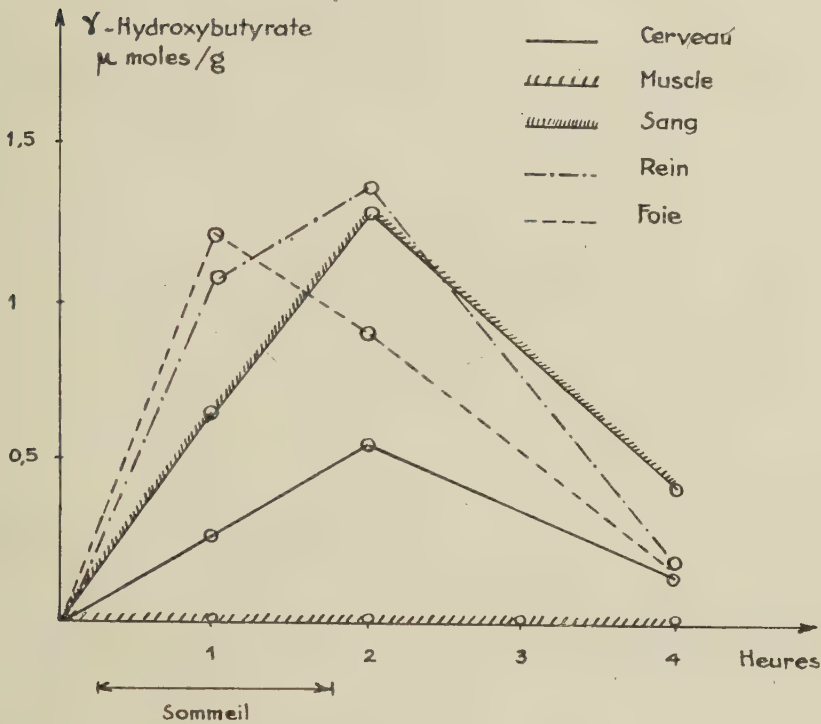


Fig. 2. — Dosage de l'acide gamma-hydroxybutyrique dans différents tissus, chez le rat, après injection intra-péritonéale de gamma-hydroxybutyrate de sodium (5 mEq/kg). D'après S.P. Bessman et S.J. Skolnik (26).

b) L'injection de butyrolactone est suivie d'une narcose qui s'installe rapidement (5 minutes environ) et qui dure 5 heures environ. Elle s'accompagne d'une augmentation rapide de la concentration en butyrolactone dans les tissus, avec un maximum une heure après l'injection, dans le cerveau en particulier. Ce taux cérébral s'abaisse ensuite progressivement au cours des trois heures suivantes (fig. 4).

La concentration de l'acide 4-hydroxybutyrique augmente légèrement au cours de cette expérience, entre la troisième et la quatrième heure.

Il semble donc d'après ces essais que l'installation et la durée de la narcose soient liées à la présence de la lactone dans le cerveau et non à celle de l'anion.

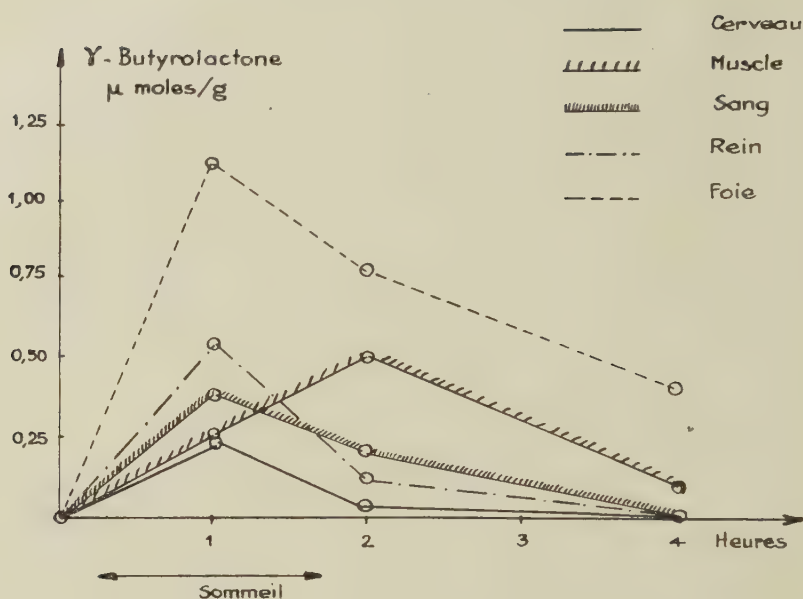


Fig. 3. — Dosage de la gamma-butyrolactone dans différents tissus chez le rat, après injection intra-péritonéale de gamma-hydroxybutyrate de sodium (5 mEq/kg). D'après S.P. Bessman et S.J. Skolnik (26).

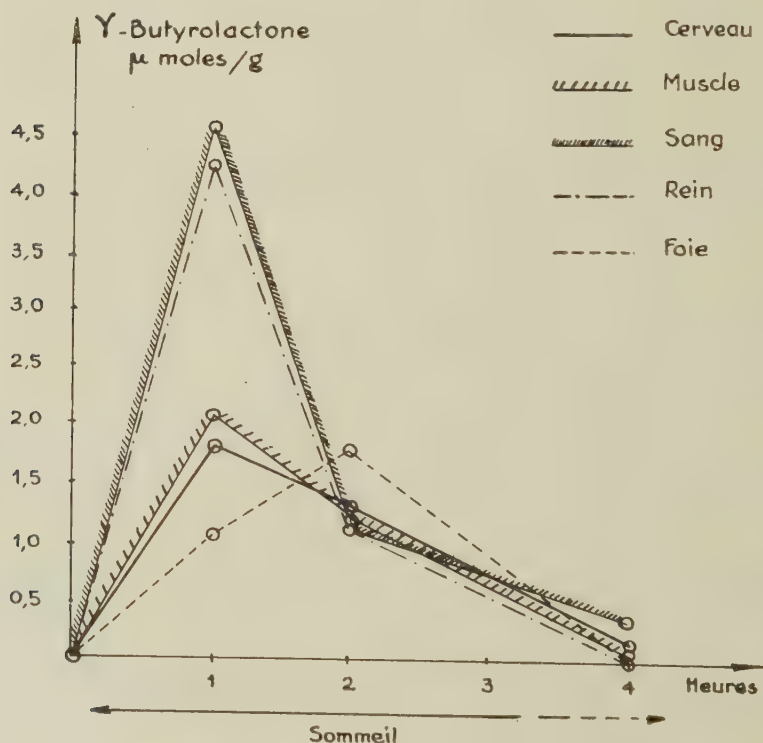


Fig. 4. — Dosage de la gamma-butyrolactone dans différents tissus, chez le rat, après injection intra-péritonéale de cette lactone (5 mEq/kg). D'après S.P. Bessman et S.J. Skolnik (26).

Des résultats absolument contradictoires ont été obtenus cependant par GIARMAN et ROTH (77), bien que leurs essais aient été conduits de façon identique : des doses correspondant à 5,8 mEq/kg de 4-butyrolactone ou de 4-hydroxybutyrate de sodium sont injectées par voie intra-veineuse, chez le rat. Les dosages sont effectués en utilisant la technique de chromatographie en phase gazeuse mise au point par les auteurs :

a) Lorsque les animaux reçoivent 500 mg/kg de 4-butyrolactone, l'arrivée de la lactone dans le cerveau est très rapide et une concentration maximale de 10μ Moles/g est atteinte en 1 mn seulement. Mais cette haute concentration disparaît très rapidement, probablement par remise en circulation dans tout l'organisme et par transformation en acide 4-hydroxybutyrique.

Quand le taux d'acide 4-hydroxybutyrique atteint dans le cerveau ce qui paraît être sa concentration critique, soit 70μ g/g (ou $0,8 \mu$ Mole/g) les animaux perdent le réflexe de posture et tombent dans un état catatonique. Il semble donc évident que l'apparition de la narcose est liée à la présence dans le cerveau d'une concentration suffisante en anion et non pas à la présence de la butyrolactone comme le suggèrent BESSMAN et SKOLNIK (26).

Cette hypothèse paraît confirmée par le fait que une minute après l'injection de butyrolactone, lorsque cette substance atteint une concentration de 800μ g/g (soit 10μ Moles/g), dans le cerveau, les animaux sont encore éveillés et semblent normaux. De même, quand la concentration en acide-alcool tombe au-dessous de la concentration critique de 70μ g/g, les animaux s'éveillent et retrouvent leurs réflexes de posture.

b) Lorsque les animaux reçoivent par voie intraveineuse une quantité équivalente de 4-hydroxybutyrate de sodium, soit 732 mg de sel de sodium par kilogramme, l'acide-alcool ne semble pas être converti en butyrolactone dans le sang ou le cerveau en quantités détectables. Contrairement au cas précédent, il passe beaucoup plus lentement dans le cerveau et atteint la concentration critique qui provoque la narcose 8 à 12 minutes après l'injection, au lieu de 5 à 7 minutes dans le cas de la butyrolactone. La réapparition des réflexes de posture coïncide avec la chute de la concentration en anion dans le cerveau au-dessous de la valeur critique. La durée de la narcose est plus courte qu'après l'injection de la lactone car la concentration en 4-hydroxybutyrate dans le

cerveau n'atteint pas un taux aussi élevé qu'après injection de butyrolactone (140 $\mu\text{g/g}$ au lieu de 240 $\mu\text{g/g}$) et par conséquent ne se maintient pas aussi longtemps au-delà de la valeur critique de 70 $\mu\text{g/g}$.

Nous n'avons pas envisagé dans notre travail cet aspect du problème. En fait, il repose sur les possibilités d'un équilibre entre la lactone et l'acide-alcool correspondant. Ce phénomène, général, est bien connu mais nous n'avons pas cru dénué d'intérêt de faire le point de nos connaissances sur le processus biologique de lactonisation et délactonisation.

5. — LACTONISATION ET DÉLACTONISATION EN BIOCHIMIE *

Sans parler des lactones existant dans les extraits végétaux et les champignons, notamment dans les essences (coumarine...) et quelques antibiotiques (érythromycine, oleandromycine, méthylmycine...) les composés présentant une fonction lactonique sont d'un grand intérêt en biochimie animale.

Rappelons tout d'abord que l'acide ascorbique ou vitamine C, facteur d'oxydo-réduction dans l'organisme est une gamma lactone éthylénique.

Certaines lactones ne sont que des composés biologiques transitoires produits des métabolismes intermédiaires. Il en est ainsi par exemple des lactones intervenant dans le métabolisme des oses.

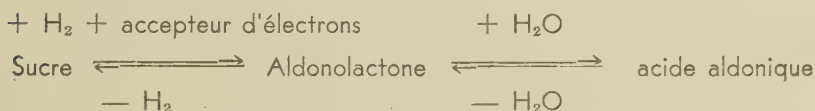
— Par ailleurs, l'acide mévalonique, acide 3,5-dihydroxy, 3-méthyl pentanoïque, précurseur du squalène dans la biosynthèse du cholestérol (82) se trouve en général sous sa forme lactonique.

— Une lactonisation suivie d'une délactonisation permet de passer de l'acide cis-cis muconique à l'acide β -céto-adipique. Ces réactions se produisent dans certains extraits bactériens au cours de « l'aromatic pathway » qu'emprunte le tryptophane pour se convertir en acide β -céto-adipique (44-142-176).

* N.B. : Un travail bibliographique intitulé « lactonisation - délactonisation en Biochimie » (non publié) a été effectué par Mme ZOLL en 1961, dans le cadre des Travaux Pratiques de 4^e Année de Pharmacie.

La fonction lactone semble donc jouer un rôle important en biochimie.

Les quelques exemples que nous venons de citer permettent d'envisager dans l'organisme, un processus d'équilibre entre une lactone et l'acide hydroxylé correspondant. Un exemple nous est fourni au cours du cycle des pentoses dans lequel la lactone est le stade intermédiaire de l'oxydation biochimique du sucre en acide aldonique, selon le schéma suivant :



L'équilibre de la première partie de la réaction est en faveur de la lactone : l'aldose sous sa forme cyclique est déhydrogéné sur le carbone pseudoaldéhydrique et conduit à la lactone de l'acide aldonique correspondant, celle-ci est hydrolysée ensuite pour donner l'acide aldonique lui-même.

Quels sont les facteurs qui régissent ces équilibres? En ce qui concerne la butyrolactone nous avons déjà mentionné qu'en solution aqueuse in vitro, l'hydrolyse dépend de la température et du pH du milieu : à 37° C et pour un pH de 7,3, c'est-à-dire dans des conditions physiologiques, un équilibre est rapidement atteint entre la 4-butyrolactone et l'acide 4-hydroxybutyrique.

De même l'hydrolyse spontanée des aldonolactones est rapide aux pH compris entre 5 et 7 ; elle existe aussi aux pH physiologiques, mais on a montré qu'elle est insuffisante pour expliquer la conversion de ces lactones en acides correspondants (34-45).

L'hydrolyse des aldonolactones en biochimie, doit donc être catalysée enzymatiquement.

On sait depuis longtemps que la formation de la lactone à partir du sucre dans le cycle des pentoses est une réaction catalysée par des déhydrogénases (34-45-159-174), mais l'intérêt principal de ces recherches est dû au fait qu'elles font état du rôle joué par des lactonases. Ces enzymes lactonisants et délactonisants ont été peu étudiés jusqu'ici (34-45-102-105-202-203). Cependant, d'autres lactonases ont pu être isolées au cours de travaux

portant sur la biosynthèse de l'acide ascorbique chez les animaux, à partir d'homogénéisats de foie et de rein notamment chez le rat. Citons :

une gulonolactonase (40-41) et une glucuronolactonase (41),

une aldonolactonase (102), une lactonase-I (103) qui agit sur plusieurs substrats et est activée par les ions Mg^{++} et Mn^{++} , enfin une uronolactonase (203).

Il semble que si certaines espèces animales ont besoin d'un apport alimentaire en vitamine C, c'est parce que chez elles, une déficience enzymatique bloque la biosynthèse de l'acide ascorbique. BURNS (37) a montré en effet, que le foie de rat convertit la L-gulono-gamma-lactone C^{14} en acide ascorbique alors que chez l'Homme, le singe ou le cobaye, cette synthèse hépatique n'existe pas.

La 4-butyrolactone et l'acide 4-hydroxybutyrique n'ont fait l'objet, à notre connaissance, d'aucune étude de cet ordre. Il est possible cependant que grâce à la mise en jeu d'une lactonase encore non identifiée, un équilibre biologique soit rapidement atteint dans l'organisme entre la lactone et l'acide correspondant. Certains facteurs pourraient intervenir sur l'activité de cet enzyme et nous pouvons aussi nous demander si, dans des conditions expérimentales particulières, l'équilibre de la réaction ne serait pas déplacé en faveur de l'une ou l'autre forme.

Nous avons vu plus haut, combien il est difficile de faire la part de ce qui revient à l'hydroxybutyrate de sodium et à la butyrolactone dans l'activité centrale de l'un ou l'autre de ces deux composés. Tout au plus peut-on souligner que, molécule non chargée, la butyrolactone doit vraisemblablement franchir plus aisément la barrière hémato-encéphalique, ce qui expliquerait ses effets plus rapides et plus constants que ceux de l'hydroxybutyrate de sodium.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAIL PERSONNEL

CHAPITRE PREMIER

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

I. — MISE EN JEU D'UNE CARENCE EN PYRIDOXINE

I. - Choix de l'espèce animale :

Toutes nos recherches ont été effectuées sur le rat blanc souche WISTAR, qui constitue l'une des espèces de Laboratoire les plus couramment employées, permettant d'opérer sur un grand nombre d'animaux.

En outre,

— cet animal est sensible à l'action dépressive de la BL (19)

— une avitaminose B6 est facilement réalisable chez le rat, en le soumettant à un régime synthétique équilibré en principes énergétiques et carencé exclusivement en pyridoxine (86)

— l'étude polygraphique du sommeil chez le rat (115-143) a permis de mettre en évidence des états périodiques de sommeil, avec activité corticale, disparition de l'activité tonique des muscles de la nuque, ralentissement cardiaque, accélération respiratoire et mouvements des vibrisses, assimilables à la phase rapide de sommeil du chat (110-111). Cette étude a donc rendu possible l'utilisation du rat au cours de nos recherches.

2. - Réalisation de la carence :

Tous les essais ont été réalisés sur des rats mâles, d'un poids moyen de 100 ± 10 g au début de l'expérimentation.

L'avitaminose a été obtenue sur des lots homogènes de 10 rats, dans les conditions expérimentales décrites par F. HARDING (86) en soumettant les animaux à un régime synthétique équilibré en principes énergétiques et carencé exclusivement en pyridoxine.

Le régime de base présente la composition suivante par kilogramme :

Caséine dévitaminée	149 g
Saccharose	690 g
Margarine	90 g
Cellulose	20 g
Huile de tournesol	10 g
Cystine	1 g
Sels minéraux (mélange d'ORENT-KEILES [149])	40 g

Vitamines en mg par kilogramme de régime sec :

Chlorhydrate de thiamine	4
Riboflavine	6
Acide nicotinique	40
Pantothénate de calcium	40
Biotine	0,2
Acide folique	0,4
Choline	1000
Tocophérol	30

Les vitamines A et D sont apportées sous forme d'un concentré titrant 50.000 U.I. d'axérophtol et 10.000 U.I. de calciférol par ml et dont il est donné 1 goutte par semaine et par animal.

Après incorporation de 150 g d'eau, le régime est donné aux rats sous forme de boulettes, ad libitum, ainsi que l'eau de boisson.

Pour chaque expérience, il a été constitué un lot témoin recevant le régime de base supplémenté en pyridoxine (5 mg/kg de régime sec).

3. - Technique de contrôle de l'avitaminose B₆ :

A - Sur le plan physiologique :

Le développement de la carence a été suivi par l'étude comparée de la courbe pondérale des animaux, et par l'évolution des signes cliniques de l'avitaminose.

— L'évolution pondérale est fortement réduite chez les animaux carencés en pyridoxine.

— Les lésions cutanées sont à l'origine de la découverte de la vitamine B₆ par GYORGY, en 1934. En effet, il observa que les rats mis à un régime carencé en vitamines du complexe B, mais complété par des rations suffisantes en riboflavine et en thiamine, présentaient des lésions dermatologiques qui guérissaient par addition au régime d'un facteur présent dans la fraction de la levure de bière absorbée par la terre à foulon. L'importance de ces lésions a valu à la pyridoxine plusieurs appellations telles que vitamine antidermatosique ou antipellagreuse du rat, ou encore « adermine ».

Chez le rat apparaissent aux yeux, aux oreilles, aux narines, au museau et aux pattes un gonflement, de la rougeur, une desquamation, parfois de l'œdème. L'ensemble de ces symptômes constitue l'acrodynie ou dermatite du rat. On ne peut encore affirmer avec certitude que ces manifestations résultent d'une carence portant uniquement sur la pyridoxine. Néanmoins, il nous a paru intéressant de suivre, au cours de nos essais, ces signes dermatosiques de l'avitaminose.

— Les troubles nerveux provoqués, soit par une carence d'apport en pyridoxine, soit par l'ingestion d'antagonistes et d'anti-métabolites de cette vitamine (hydrazides, méthoxypyridoxine, désoxypyridoxine...) consistent en crises épileptiformes, tremblements musculaires, abolition des réflexes, pouvant se compliquer d'une paralysie du train postérieur. L'étude de ces manifestations nerveuses nous a amené à rechercher les modifications éventuelles de l'EEG du rat en phase de veille et en phase de sommeil, au cours de la réalisation d'une carence en pyridoxine. Il ne s'agit pas là d'un test de contrôle, mais d'une étude des effets de l'avitaminose B₆ sur le sommeil physiologique, étude qui doit être intégrée dans notre plan de recherches.

Les enregistrements EEG ont été effectués après implantation, sous anesthésie générale au penthiobarbital, de très fines électrodes en acier inoxydable, au niveau des régions frontales et pariétales du calvarium. En même temps que l'électrocorticogramme nous avons enregistré l'électromyogramme des muscles de la nuque au moyen d'électrodes en or fixées à demeure.

Les enregistrements ont été réalisés au cours de l'après-midi, les animaux placés dans une cage métallique insonorisée, disposant d'eau et de nourriture.

B - Sur le plan biologique :

Nous avons choisi pour contrôler la carence en pyridoxine chez le rat, le test de surcharge en tryptophane. Le rôle de la vitamine B₆ dans le métabolisme de cet amino-acide a donné lieu à de nombreux travaux. Sous forme de pyridoxal-phosphate, elle participe à la formation de la co-cynuréninase et de la co-cynurénine-transaminase (116-148). La carence entraîne de graves perturbations dans le métabolisme du tryptophane, au niveau de sa transformation en dérivés anthraniliques et nicotiniques. En particulier, on voit apparaître dans les urines, des quantités anormales de cynurénine, de 3-hydroxycynurénine et d'acide xanthurénique, après administration de doses importantes de tryptophane (11-47-55-86). Le tableau suivant résume la conversion du tryptophane en dérivés nicotiniques. Le niveau d'action de la pyridoxine tel qu'il a été défini par DALGLIESH (55) y est indiqué par la ligne A - A (Tableau I).

Bien que le test de surcharge en tryptophane ne soit pas en lui-même un moyen de contrôle spécifique et d'une carence en pyridoxine (87), nous avons pensé que son association aux techniques de contrôle physiologique constituait dans nos conditions expérimentales, un ensemble de critères suffisants pour définir un état de carence en cette vitamine.

Conduite des essais :

Les animaux en expérimentation reçoivent per os une dose test de L-Tryptophane (1 mg/g de poids corporel). Ils sont placés dans des cages à métabolisme et les urines sont recueillies quantitativement pendant les 24 heures qui suivent l'administration de la surcharge.

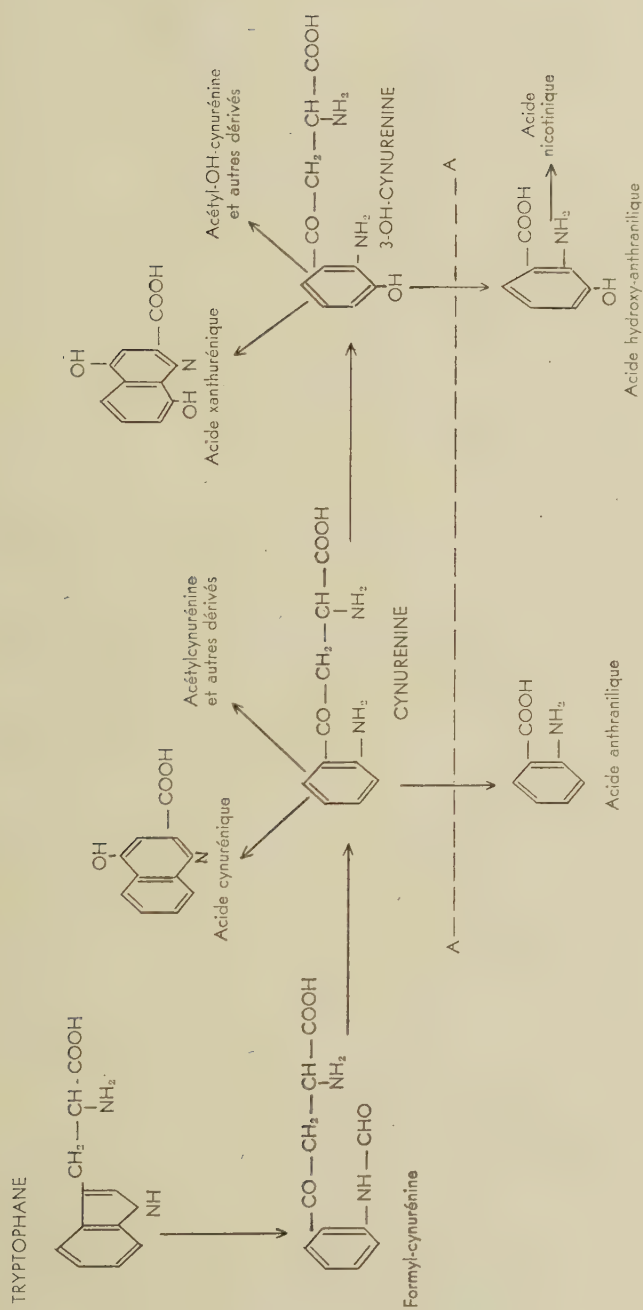


TABLEAU I : Conversion du tryptophane en dérivés nicotiniques
A ---- A : Niveau d'action de la vitamine B₆

a) Examen des urines :

— Caractérisation de l'acide xanthurénique

Test à l'alun ferrique en milieu bicarbonaté (86).

A 2 ml d'urine saturée de CO_3NaH , ajouter une solution à 0,425 % d'alun ferrique, goutte à goutte jusqu'à ce que la coloration n'augmente plus. La présence d'acide xanthurénique est marquée par une coloration verte.

— Séparation chromatographique des métabolites urinaires du L-Tryptophane (technique de DALGLIESH [55]).

Une extraction préalable est indispensable.

Diluer les urines dans un égal volume d'acide acétique à 50 % (v/v). Après un repos de 12 h à la glacière, centrifuger, décantier le surnageant et l'agiter pendant 15 mn avec du charbon végétal désactivé*.

Récupérer le charbon sur buchner, le laver à l'eau distillée, puis le traiter par une solution de phénol à 5 % (p/v). L'éluat obtenu est jaune. Après évaporation sous vide partiel, à 40° C, reprendre le résidu par 1 ml d'eau distillée et l'étudier par chromatographie descendante unidimensionnelle sur papier Whatman n° 1, en phase Butanol — acide acétique — eau (4-1-5).

Laisser migrer pendant 18 heures puis sécher en étuve à 40° C.

Révélation du chromatogramme.

— Par exposition aux rayons ultra-violets (lampe de WOOD) : les métabolites du tryptophane sont révélés par l'apparition d'une fluorescence intense bleue ou verte.

— Par pulvérisation du réactif d'EHRlich (solution à 2 % de paradiméthylaminobenzaldéhyde dans ClH à 5 % (v/v) : apparition d'une coloration rose ou jaune orangé.

* Charbon végétal désactivé : Traiter 50 g de charbon actif avec 200 ml d'une solution à 2 % d'acide stéarique dans de l'éthanol. Agiter et laisser en contact pendant 1 heure. Décantier et laver le charbon à plusieurs reprises avec de l'eau distillée. Filtrer et sécher sous vide en présence d'actigel (d'après Synge (R.L.M.) and Tiselius (A.), Acta Chem. Scand., 1949, 3, 231.

— Par la réaction de Pauly :

Réactifs nécessaires :

- 1 - Solution d'acide sulfanilique à 0,5 % dans ClH à 2 %
- 2 - Solution de nitrite de sodium à 0,5 % (p/v)
- 3 - Solution de bicarbonate de sodium à 10 % (p/v).

Mélanger à parties égales les solutions 1 et 2 et pulvériser le chromatogramme avec cette préparation. Pulvériser ensuite la solution 3.

L'hydroxycynurénine et ses dérivés ainsi que ceux de la cynurénine sont révélés par l'apparition de spots brun-rouge.

b) Dosage de l'acide xanthurénique.

La coloration verte que donne l'acide xanthurénique avec les sels ferriques, a permis à GLAZER et coll. (79), de mettre au point une technique de dosages colorimétrique de cet acide dans les urines.

— Mode opératoire

Introduire dans un tube à essais :

- 1 ml de solution saturée de CO_3NaH
- 0,25 ml de solution d'alun ferrique $(\text{SO}_4)_2 \text{NH}_4\text{Fe}$ à 0,425 %. Agiter jusqu'à disparition du louche formé
- 1 ml d'urine centrifugée. Agiter
- 7,5 ml d'eau distillée
- 1 goutte de phénolphtaléine
- 3 gouttes de ClH N (disparition de la coloration rose).

Attendre 4 minutes et lire au spectrophotomètre à $620 \text{ m}\mu$ (maximum d'absorption de l'acide xanthurénique) en utilisant comme blanc le mélange de réactifs en l'absence d'urine.

La coloration est stable pendant 20 minutes.

— Gamme étalon

Pour chaque série de dosage établir une gamme étalon à partir d'une solution mère d'acide xanthurénique titrant 0,02 % :

Dilution	Solution mère	Concentration en μg	Solution de CO_3HNa	Alun ferrique	ClH	Phénol-phtaléine	Eau distillée
I	0,5 ml	100	1 ml	0,25 ml	III gtes	I gte	8 ml
II	1	200	I	0,25	III	I	7,5
III	2	400	I	0,25	III	I	6,5
IV	3	600	I	0,25	III	I	5,5
V	4	800	I	0,25	III	I	4,5

La lecture de la densité optique est effectuée dans les mêmes conditions que précédemment.

Remarques : Nous avons vérifié que la courbe d'étalonnage suit la loi de BEER-LAMBERT, pour des concentrations en acide xanthurénique comprises entre 100 et 800 μg . Nous avons donc été amenés, quelquefois, à diluer l'urine recueillie afin de rester dans la zone de concentration permettant d'effectuer un dosage.

II. — EFFETS DE LA CARENCE EN PYRIDOXINE SUR LA TENEUR EN AMINO-ACIDES, DU TISSU CÉRÉBRAL

Les propriétés biologiques de la pyridoxine ont donné lieu à un très grand nombre de travaux. Sous la forme de pyridoxal-5-phosphate, elle s'est révélée être un coenzyme actif qui catalyse un grand nombre de réactions biochimiques dans le métabolisme des acides aminés, des acides gras et des hydrates de carbone (11-151).

Son rôle particulièrement important dans le métabolisme des acides aminés, nous a conduit à envisager l'étude des modifications qualitatives éventuelles que sa carence pourrait entraîner, dans la teneur du tissu cérébral en aminoacides.

I. - Extraction et détermination qualitative des acides aminés du cerveau :

Nos expériences ont porté parallèlement :

— sur des cerveaux de rats soumis au régime carentiel de base depuis 40 jours

— sur des cerveaux de rats prélevés dans le lot témoin appartenant à la même série expérimentale.

Afin d'éviter, d'une part les modifications qu'est susceptible d'entraîner la façon dont sont sacrifiés les animaux, d'autre part la libération post-mortem à température ordinaire, des amino-acides des tissus cérébraux (4-63), nous avons procédé par décapitation rapide, puis congélation immédiate des têtes dans l'air liquide, et pendant toute la durée de la dissection, les cerveaux ont été maintenus à une température inférieure à 0° C.

A) Préparation des cerveaux en vue de l'extraction des amino-acides (132).

— Déprotéinisation.

Peser le tissu et le broyer à l'aide d'un homogénéiseur (type Ultra-Turax) *, dans 5 ml d'alcool éthylique à 60°. Après centrifugation 5 mn à 10.000 tours/mn et séparation du surnageant, laver le culot de centrifugation successivement 3 fois avec 5 ml d'alcool. Réunir les liquides de lavage et le surnageant initial et évaporer l'éthanol sous vide partiel à 40° C. L'extrait aqueux obtenu (environ 7 à 9 ml) est trouble.

— Délipidation.

Dans un tube à centrifuger bouchant émeri, contenant 0,2 ml d'acide formique 2 M, par gramme de tissu traité, transvaser l'extrait précédent. Ajouter un volume égal d'éther de pétrole. Agiter vigoureusement le tube et le placer à la glacière pendant 15 mn. Après centrifugation rapide (10.000 à 12.000 t/mn), pipeter la couche éthérée. Renouveler 2 fois l'extraction des lipi-

* N.B. — Eviter tout échauffement au cours de ce traitement.

des par l'éther de pétrole. Après la dernière centrifugation l'« insoluble » * se sépare sous la forme d'un disque à l'interface de la couche aqueuse et de la couche d'éther de pétrole. Prélever la phase aqueuse contenant les acides aminés.

— Déminéralisation (147).

Passer la solution aqueuse précédente (8 ml environ) sur une colonne de résine cationique : Permutite 50, sous sa forme acide. Laver la colonne à l'eau fraîchement bidistillée et éluer les acides aminés à l'aide d'une solution d'ammoniaque N. Régénérer la résine au moyen d'une solution d'acide chlorhydrique 2N.

B) Séparation chromatographique des amino-acides (43).

Concentrer l'éluat précédemment obtenu (150 ml) sous vide partiel à température inférieure à 40° C. Reprendre le résidu par 0,5 ml d'ammoniaque au 1/5, par gramme de tissu.

L'extrait est soumis à une chromatographie bi-dimensionnelle descendante, sur papier Whatman n° 1, en utilisant les systèmes solvants suivants :

1 - Butanol — acide acétique — eau (40-10-50). Migration 18 h.

2 - Phénol — eau (90-10), en présence d'un cristal de cyanure de sodium et d'une solution aqueuse d'ammoniaque à 0,3 pour 100. Migration : 24 h.

Les chromatogrammes sont séchés à l'air, à température ordinaire pendant 24 heures, et révélés par pulvérisation d'une solution de ninhydrine dans un mélange : butanol — acide acétique.

ninhydrine	0,2 g
butanol	15 ml
acide acétique	5 ml

Les spots d'acides-amino apparaissent sur le chromatogramme après un séjour de 5 mn à l'étuve à 100° C.

* N.B. : Il s'agit des éléments cellulaires plus ou moins altérés au cours du broyage mécanique.

C) Identification des acides aminés isolés.

Les amino-acides ont pu être révélés à la ninhydrine avec une précision suffisante, ce qui a permis de déterminer leur Rf dans les deux systèmes solvants employés :

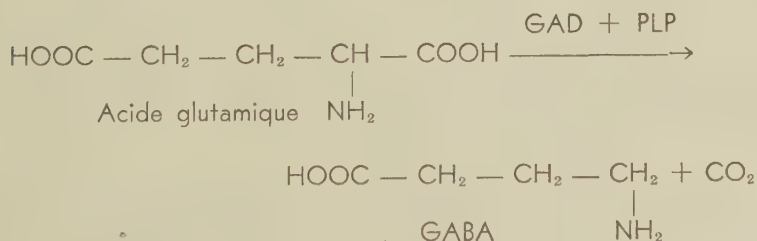
Ils ont été identifiés

- en comparant nos résultats
 - aux données de la littérature
 - aux Rf obtenus dans les mêmes conditions expérimentales avec des mélanges d'acides aminés témoins
- en utilisant des témoins déposés en surcharge sur le spot de départ de l'extrait à chromatographier.

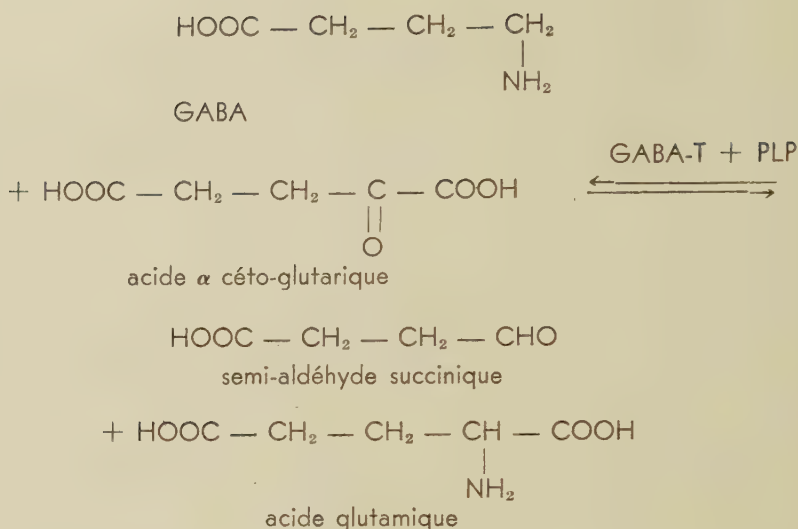
2. - Dosage de l'acide gamma amino-butyrique.

Le rôle dévolu à la pyridoxine sous forme de phosphate de pyridoxal (PLP) dans les réactions de décarboxylation et de transamination, est connu depuis plusieurs années. Dans le métabolisme oxydatif du GABA, elle intervient essentiellement à deux niveaux (161-163-186) :

1) Dans la réaction de décarboxylation de l'acide glutamique en GABA, en tant que coenzyme de la décarboxylase glutamique (GAD)



2) Dans la transformation du GABA en semi-aldéhyde succinique, en tant que coenzyme de la GABA — transaminase (GABA - T)



a) In vitro la GAD a moins d'affinité pour le PLP que la GABA-T. Elle est donc plus dissociée de son coenzyme et particulièrement sensible à une carence en PLP ou à une interférence dans le métabolisme de ce dernier. De nombreuses expériences in vitro et in vivo l'ont prouvé :

— C'est ainsi que chez les animaux traités par les hydrazides (thiosemicarbazide, isoniazide...) il a été démontré que les crises convulsives s'accompagnent d'une baisse du taux cérébral de GABA (112-113) et peuvent être prévenues par l'administration de pyridoxine qui s'est révélée un antidote efficace des hydrazides.

— Les actions antagonistes du GABA et de la pyridoxine ont été mise en évidence d'autre part, par l'action de la 4-méthoxy-pyridoxine (15) : son administration provoque des convulsions au cours desquelles le taux cérébral de GABA est abaissé et la pyridoxine supprime ces convulsions.

Or, au cours de ces expériences in vitro et in vivo, il a été démontré que l'activité de la GAD est considérablement diminuée (21-75-112-113-163-168-186). Pour la plupart des auteurs qui ont étudié ce problème, le blocage de la décarboxylation est attribué à une déficience en coenzyme, soit par formation d'hydrazone inactive (les hydrazides agissant dans cette réaction en tant que piège à carbonyles) (10-112-113), soit par inhibition de la pyri-

doxal-phospho-kinase, enzyme phosphorylant le pyridoxal à partir de l'ATP (81-131-166).

— Des expériences in vitro par incubation d'échantillons de cerveaux, ont montré qu'une carence alimentaire en pyridoxine conduit également à une diminution :

- de l'activité de la GAD
- de la vitesse de formation du GABA.

b) La GABA-T qui, comme la GAD, est activée par le PLP, est plus solidement liée à ce coenzyme, donc moins sensible à une déficience en PLP. Cependant BAXTER et ROBERTS (13-14) ont obtenu une augmentation du taux cérébral de GABA par action de l'hydroxylamine, et il semble bien que cet effet soit lié à une inhibition préférentielle de la GABA-T, par formation d'une oxime entre le groupement aldéhydique du PLP et l'hydroxylamine. Cette inhibition peut être levée par injection de PLP à des taux élevés.

Un autre agent inhibiteur de la GABA-T est l'acide aminoxy-acétique dont l'effet in vitro et in vivo se traduit par une augmentation considérable du taux de GABA (200-201). La nature de l'inhibition est, dans ce cas, strictement compétitive car l'addition de PLP ne modifie pas l'action inhibitrice de cet acide.

Néanmoins, le rôle de la pyridoxine et du PLP dans le métabolisme oxydatif du GABA est extrêmement important. C'est pourquoi il ne nous a pas paru dénué d'intérêt de vérifier les effets in vivo, d'une carence en pyridoxine chez le rat, sur le métabolisme du GABA, par un dosage de cet amino-acide dans le tissu cérébral. Cet essai a été complété par l'étude des effets d'une surcharge en phosphate de pyridoxal* sur les taux de GABA présents dans le cerveau, chez les rats carencés ou non en pyridoxine.

A) Choix d'une technique de dosage.

De nombreuses techniques ont été proposées pour extraire, caractériser et doser le GABA dans le cerveau. Il s'agit essentiellement de techniques de séparation des amino-acides par chro-

* N.B. : Le phosphate de pyridoxal est apporté par voie intra-péritonéale à raison de 200 μ g/rat en deux injections, la première 18 h et la deuxième 45 mn avant le sacrifice des animaux par décapitation rapide et congélation immédiate des têtes dans l'air liquide.

mato-électrophorèse (28) ou par chromatographie sur résines échangeuses d'ions et sur papier, suivie d'un dosage colorimétrique (5-17-23-146-164-185).

Des techniques de dosage enzymatiques ont également été proposées (13-200). Cependant elles se prêtent difficilement à des dosages en série. Nous avons donc mis au point une technique qui est une adaptation de celle de SANDMAN (172) et qui permet d'isoler et de doser le GABA à partir du tissu cérébral, dans des conditions expérimentales relativement simples.

B) Principe de la technique.

Cette méthode de dosage est basée sur le fait que la plupart des substances réagissant avec la ninhydrine et présentes dans le cerveau, peuvent être fixées sur une petite colonne de résine DOWEX 50 et éluées par une solution tampon à pH 3,1. Dans ces conditions, le GABA et les acides aminés basiques sont retenus par la colonne. Si les acides aminés basiques ont été éliminés au préalable par fixation sur une résine faiblement acide (AMBERLITE C G 50), le GABA reste seul fixé sur la colonne de DOWEX après traitement au tampon pH 3,1. Une élution à l'aide d'un tampon à pH 5,1 permet alors de le récupérer.

C) Matériel et réactifs.

a) colonnes de verre de 150 mm de haut et 10 mm de diamètre

b) résines :

DOWEX 50 $\times$ 8, 200 à 400 mesh. Traitée avec un alcali, lavée et tamponnée à pH 3,1 (144).

AMBERLITE C G 50, 200 à 400 mesh, purifiée et tamponnée à pH 5,1 (94).

Régénération des résines après utilisation :

— DOWEX : laver la résine placée dans la colonne avec 5 ml de NaOH 0,2 N, suivis de 10 ml d'eau fraîchement bidistillée sur permanganate, puis 10 ml de tampon pH 3,1, 0,2 N.

— AMBERLITE : régénérer la résine dans un erlenmeyer avec ClH 3 N pendant une nuit. Puis laver à l'eau fraîchement bidistillée sur permanganate et tamponner à pH 5,1 au citrate 0,2 N.

c) Tampons pour chromatographie.

D'après STEIN (WH) et MOORE (S) (145)

- Tampons à pH 3,1 $\pm$ 0,03 citrate de Na 0,2 N *
- Tampons à pH 5,1 $\pm$ 0,02 citrate-acétate de Na 2 N *

Utilisation des tampons.

pH 3,1 : Ajouter avant son emploi 5 ml de BRIJ 35 ** et 5 ml de thiodiglycol *** par litre de tampon.

pH 5,1 : Le diluer au 1/10^e de manière à obtenir une concentration en sels de 0,2 N.

Ajouter avant l'emploi 1 ml de BRIJ 35 et 5 ml de thiodiglycol.

Conservation.

Ces tampons doivent être préparés avec le plus grand soin, en utilisant de l'eau fraîchement bidistillée sur permanganate de potassium, exempt de matières organiques et d'ammoniaque. Ils doivent être conservés à la glacière et renouvelés chaque semaine.

d) Réactif à la ninhydrine.

Il est préparé selon la technique de MOORE et STEIN (146), avec une légère modification : le tampon pH 5,5 est remplacé par le tampon pH : 5,1 0,2 N, pH optimum pour le développement de la coloration à la ninhydrine. Ce réactif étant de conservation difficile, nous le préparons extemporanément.

* Il s'agit de la normalité par rapport à la concentration en ions sodium.

** Cette solution est obtenue en dissolvant 50 g de Brij 35 (alcool polyoxyéthylène dodécylique) dans 100 ml d'eau chaude. Fournisseur : Atlas Powder Co. Wilmington-Delaware, U.S.A. Dépositaire en France : S.E.P.I.C., 70, Av. des Champs-Élysées, Paris-8^e.

*** Utiliser le « KROMFAX solvent » de l'Union Carbide Europa S.A. Genève. Dépositaire en France : Comptoir François des Produits Aromatiques, 9, Rue Richemont, Paris-8^e.

Formule :

Ninhydrine.....	0,400 g
Hydrindantine *	0,060 g
Méthylcellosolve **	15 ml
Tampon pH 5,1 0,2 N	5 ml

D) Protocole expérimental.

a) Extraction du GABA

Prélever les cerveaux dans les conditions exposées précédemment.

Après l'avoir exactement pesé, broyer le tissu en présence de 2 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 20 % + 5 ml d'eau distillée. Centrifuger 5 mn à 10.000 t/mn, décantier le surnageant dans un ballon jaugé de 50 ml. Laver le culot de centrifugation 3 fois avec 10 ml d'eau distillée. Décantier les eaux de lavage dans le ballon jaugé et compléter à 50 ml avec de l'eau distillée. Prélever une partie aliquote de 5 ml, la neutraliser dans un erlenmeyer avec de la soude 2 N, ajouter 1 g d'amberlite tamponnée à pH 5,1 et agiter pendant une heure sur agitateur mécanique.

Parallèlement, traiter dans les mêmes conditions :

— une deuxième partie aliquote de 5 ml, additionnée de 0,25 μ Mole de GABA pur en solution ;

— 5 ml d'eau bidistillée destinée à l'obtention d'un blanc de lecture au spectrophotomètre.

Les colonnes de résine étant montées suivant le schéma ci-joint (fig. 5) verser le contenu des erlenmeyers au sommet de la colonne d'Amberlite. Laver trois fois avec 5 ml d'eau bidistillée. Eliminer l'éluat qui passe à travers les deux colonnes superposées.

* Hydrindantine : Ce produit est préparé en réduisant la ninhydrine par l'acide ascorbique : A une solution de 4 g de ninhydrine dans 100 ml d'eau à 90° C, ajouter en agitant une solution de 4 g d'acide ascorbique dans 20 ml d'eau à 40° C. Abandonner pendant 30 mn à température ordinaire : l'hydrindantine cristallise. Refroidir pendant 1 heure sous un courant d'eau. Laver les cristaux à l'eau distillée et les sécher jusqu'à poids constant en présence d'actigel et à l'obscurité. Conserver en flacon coloré et hermétiquement clos.

** Méthylcellosolve : Ether monoéthylique de l'éthylène glycol.

Après les trois lavages, séparer les colonnes. Traiter la colonne de DOWEX une fois avec 5 ml de tampon à pH 3,1 0,2 N et une fois avec 7 ml du même tampon. Ajouter alors le tampon pH 5,1 0,2 N et recueillir l'éluat dans une fiole jaugée de 10 ml.

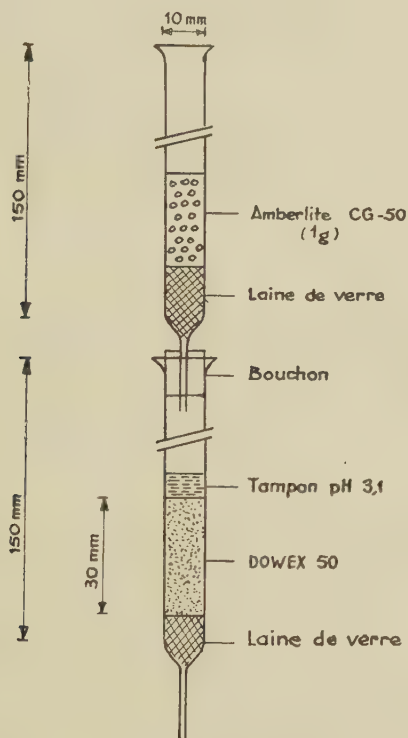


Fig. 5. — Montage des colonnes de résines échangeuses d'ions en vue de l'extraction de l'acide gamma-amino-butyrique. D'après R.P. Sandman (172).

Prélever une partie aliquote de 2 ml pour effectuer le dosage du GABA selon la méthode de MOORE et STEIN (146).

b) Dosage colorimétrique

Dans les tubes bouchant émeri, mettre :

- 2 ml d'éluat à pH 5,1 - 0,2N
- 1 ml de réactif à la ninhydrine - hydriindantine.

Agiter 10 secondes.

Plonger les tubes dans un bain-marie bouillant pendant 15 minutes exactement.

Après refroidissement à 30° C environ, agiter énergiquement les tubes pendant 30 secondes à l'air libre, afin de provoquer l'oxydation de l'hydrindantine qui pourrait subsister, et d'éliminer ainsi une coloration rouge gênante lors de la lecture colorimétrique au spectrophotomètre JOBIN-YVON à 570 m μ . Nous avons vérifié que la réaction colorée suit la loi de BEER-LAMBERT pour des concentrations comprises entre 0,02 et 0,125 μ mole/ml.

c) Gamme d'étalonnage

Pour chaque série de dosages, nous avons préparé une gamme étalon à partir des solutions suivantes :

Solution A : 103 mg de GABA pour 500 ml d'eau bidistillée, soit une concentration de 2 μ moles/ml.

Solution B : 12,5 ml de solution A

4 ml de solution trichloracétique à 20 %

Eau bidistillée q.s.p. 100 ml

Soit une concentration en GABA de 0,25 μ mole/ml.

Constitution de la gamme étalon

	Solution B en ml	Quantité correspondante de GABA présente dans 2 ml d'éluat à pH 5,1	Eau
1	1 ml	0,050 μ moles	4 ml
2	2	0,100	3
3	3	0,150	2
4	4	0,200	1

Les échantillons ainsi obtenus sont soumis à un traitement par les résines dans les mêmes conditions que lors du dosage dans les extraits de cerveau.

E) Discussion de la méthode

a) Vérification de l'identité du GABA

Au cours des essais de mise au point de cette technique de dosage, nous avons vérifié que le GABA était effectivement isolé de tous les autres amino-acides ainsi que des composants réagissant avec la ninhydrine, présents dans l'extrait trichloracétique.

Nous l'avons caractérisé dans l'éluat tamponné à pH 5,1 par chromatographie unidimensionnelle descendante sur papier Whatman n° 1, après déminéralisation sur DOWEX 50 (forme acide).

Système solvant employé : Phénol-eau (90 - 10) en présence d'un cristal de CNNa et de 100 ml de solution ammoniacale à 0,3 %.

Nous avons chromatographié parallèlement un éluat auquel nous avons ajouté une surcharge en GABA pur. Après révélation à la ninhydrine, nous avons obtenu dans les deux cas un seul spot dont le R_f est de 0,79, valeur sensiblement voisine de celle qui est fournie par la littérature pour une solution de GABA pur, dans le système solvant choisi : 0,77 (43-147).

La chromatographie, dans les mêmes conditions, d'une solution de GABA pur nous a également donné un spot de R_f 0,79.

b) Précision de la méthode

Dans la technique proposée par SANDMAN, l'auteur construit une courbe d'étalonnage par dosage direct à partir de solutions à concentration connue en GABA, tamponnées à pH 5,1. Or, nous avons été amenés à modifier ce procédé car au cours de nos essais de mise au point, nous avons constaté des pertes non négligeables lors du passage sur les colonnes de résines.

En effet, dès les premiers dosages entrepris, afin de déceler et de chiffrer une erreur éventuelle, nous avons pris la précaution de traiter parallèlement :

— un volume d'extrait trichloracétique : x ;

— un volume d'extrait trichloracétique : $x/2$, additionné d'une quantité connue a de GABA pur en solution ;

— un volume d'extrait trichloracétique : $x/2$ additionné d'une quantité connue 2 a de GABA pur en solution.

Dans ces conditions et en utilisant une courbe d'étalonnage construite selon la technique de SANDMAN, nous avons constaté pour les dosages effectués sur 6 extraits différents, une erreur relative moyenne se chiffrant par une perte pouvant atteindre 30 %.

Les pertes d'une part et les variations d'un dosage à l'autre, d'autre part, nous ont amené à traiter plusieurs échantillons x d'un même extrait trichloracétique provenant d'un « pool » de deux cerveaux. Les dosages n'ont pas été effectués en série, mais échelonnés sur plusieurs jours consécutifs. (Entre temps l'extrait trichloracétique non traité a été conservé à -10°C afin d'éviter toute modification de sa composition).

Chaque échantillon de volume x a été traité simultanément avec un échantillon de volume $x/2$ additionné d'une surcharge de $0,250\ \mu$ mole de GABA pur (correspondant à $0,050\ \mu$ mole de GABA dans 2 ml d'éluat pH 5,1).

La lecture des résultats à partir des densités optiques, a été faite sur une courbe d'étalonnage construite comme précédemment.

Dans ces conditions expérimentales, nous avons constaté :

1 - d'une part des variations dans le taux de GABA, d'un dosage à l'autre ;

2 - d'autre part, pour chaque dosage, une perte de GABA, de l'ordre de 20 à 30 % comme en témoigne le tableau II.

Afin de compléter ces recherches de mise au point, nous avons essayé de construire une courbe standard de GABA :

1 - à partir d'une gamme étalon tamponnée à pH 5,1 et se prêtant à un dosage colorimétrique direct.

2 - à partir d'une gamme étalon en milieu trichloracétique soumise à un traitement par les résines, dans les mêmes conditions que l'extrait tissulaire.

Dosages	Echantillon : x	Echantillon : x/2	Perte %
	GABA endogène *	(GABA endogène) + surcharge **	
1	0,0575	0,0550	30
2	0,0616	0,0640	20
3	0,0660	0,0640	22
4	0,0585	0,0575	27
5	0,0585		
6	0,0616		

Tableau II : Détermination des pourcentages de pertes en GABA obtenues après passage sur résine.

Les résultats de cet essai sont présentés sous forme de graphique dans la figure 6.

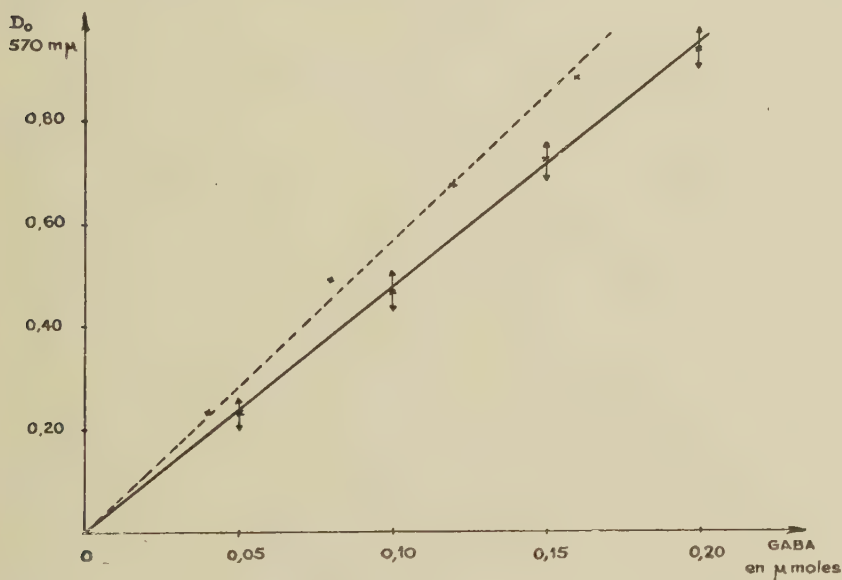


Fig. 6 : Courbes d'étalonnage de l'acide gamma-aminobutyrique

a - - - - : sans traitement par les résines.

b ——— : après passage sur résines. ***

* Résultats exprimés en μ moles de GABA dans 2 ml d'éluat pH 5,1.

** La surcharge correspond théoriquement à 0,050 μ mole de GABA dans 2 ml d'éluat pH 5,1.

*** Nous avons été amenés à effectuer une courbe étalon pour chaque dosage, ce qui nous a permis d'établir par le calcul statistique l'écart type correspondant à chacune des mesures. Nous avons également vérifié qu'en opérant le même jour, dans les mêmes conditions expérimentales, sur le même échantillon témoin, les courbes étalons sont pratiquement confondues. Les résultats que nous donnons correspondent aux valeurs moyennes obtenues à partir de 20 déterminations : $M \pm \sigma$ mt. (t 0,05).

Ils mettent en évidence une perte de GABA voisine de 20 % au cours du traitement par les résines et confirment donc les observations que nous avons faites au cours des essais précédents, effectués à partir d'extraits de cerveaux additionnés d'une surcharge en GABA.

Afin de pallier cet inconvénient, nous avons été amenés à construire systématiquement, pour chaque série de dosages, une courbe d'étalonnage obtenue à partir d'une solution titrée de GABA, traitée comme l'extrait tissulaire, par passages successifs sur les deux résines utilisées.

En outre, afin de nous assurer une plus grande marge de sécurité, nous avons effectué tous nos dosages en doubles et chaque fois nous avons contrôlé les rendements de l'extraction sur une troisième prise d'essai enrichie d'une quantité connue de GABA pur en solution ($0,25 \mu$ mole). Dans ces conditions expérimentales la précision obtenue est de ± 6 pour 100.

III. — EFFETS DE LA BUTYROLACTONE CHEZ LE RAT NORMAL OU CARENCÉ EN PYRIDOXINE

I. - Action hypnogène.

En solution à 10 p. 100 dans du soluté isotonique de chlorure de sodium, la butyrolactone * a été injectée par voie intrapéritonéale à la dose de 200 mg/kg.

A cette dose, chez le rat normal, on observe après un temps de latence de quelques minutes, une narcose qui se traduit au point de vue comportemental par la diminution du tonus musculaire. La durée en est facilement objectivée par la disparition d'un réflexe de posture tel que celui de redressement, lorsqu'on met l'animal sur le dos, ou la perte et la réapparition du réflexe de redressement de la tête. C'est ce dernier test que nous avons choisi :

* 4-Butyrolactone : Fournisseur : Eastman Kodak Company - Rochester 3 New-York.

a) Pour étudier les effets hypnogènes de la butyrolactone parallèlement :

— sur le tracé EEG et polygraphique (muscle de la nuque et EKG)

— sur l'activité spontanée,
chez le rat carencé ou non en pyridoxine.

b) Pour comparer les effets hypnogènes de la butyrolactone chez le rat normal et chez le rat carencé. Cette comparaison porte essentiellement sur le temps de latence et sur la durée de l'état catatonique.

Nos essais ont été effectués sur plusieurs lots homogènes de rats carencés et de rats normaux.

c) Enfin, pour étudier les effets de la butyrolactone chez le rat carencé ou non, recevant au préalable une surcharge en phosphate de pyridoxal. Nous avons entrepris cet essai afin de compléter nos recherches sur le rôle éventuel de la butyrolactone dans les processus neuro-humoraux responsables du sommeil physiologique, par l'intermédiaire d'une réaction de transamination mettant en jeu le phosphate de pyridoxal. Cette expérience a été menée comme la précédente, mais dans un second essai réalisé à quelques jours d'intervalle, l'injection de la butyrolactone a été précédée de celle de phosphate de pyridoxal également par voie intra-péritonéale, à raison de 200 μ g/rat en deux injections, l'une à 18 heures, l'autre à 45 minutes avant l'injection de butyrolactone.

2. - Dosage de l'acide gamma-aminobutyrique.

Afin de préciser l'influence de la narcose provoquée par la BL sur le taux de GABA du cerveau, nous avons effectué des dosages de cet amino-acide parallèlement sur deux lots de 9 rats témoins et deux lots de 12 rats carencés, ayant reçu par voie intra-péritonéale 200 mg/kg de BL.

Les animaux ont été sacrifiés pendant la phase de narcose (30 minutes après l'injection).

CHAPITRE II

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I. — CONTROLE DE L'AVITAMINOSE B₆

I. - Sur le plan physiologique

A) Croissance des animaux.

Le tableau III et le graphique correspondant (fig. 7) mettent en évidence une évolution pondérale fortement réduite chez les animaux carencés. Cet effet est particulièrement marqué à partir du 15^e jour de régime et se poursuit pendant toute la durée de l'essai, pouvant aller jusqu'à un arrêt presque total de l'augmentation pondérale à partir du 30^e jour.

Ces résultats sont également valables pour des rats plus âgés, pesant au début de l'expérimentation $130 \text{ g} \pm 10$.

B) Signes cliniques de l'avitaminose :

— Les symptômes cutanés n'apparaissent pas régulièrement et demeurent discrets, même après 30 à 40 jours de régime. Ils intéressent surtout les phanères : les animaux ont un poil terne et présentent une légère alopecie, plus particulièrement au niveau des oreilles et du museau. Nous avons observé également une desquamation des zones environnant les griffes et parfois une ulcération aux narines.

	Lots	Nbre d'animaux	J = 0	J = 8	J = 16	J = 24	J = 32
Rats carencés	I	20	90 ± 4,5	97 ± 5,5	110 ± 5,5	116 ± 4,5	119 ± 3,5
Rats témoins	II	20	87 ± 5	96 ± 6,5	118 ± 6	134 ± 6	144 ± 6
Rats carencés	III	10	129 ± 10		135 ± 6,5	145 ± 4,5	152 ± 7,5
Rats témoins	IV	10	134 ± 10		159 ± 12	185 ± 14	197 ± 14

TABLEAU III : Croissance pondérale (en grammes)
chez le rat carencé ou non en pyridoxine.

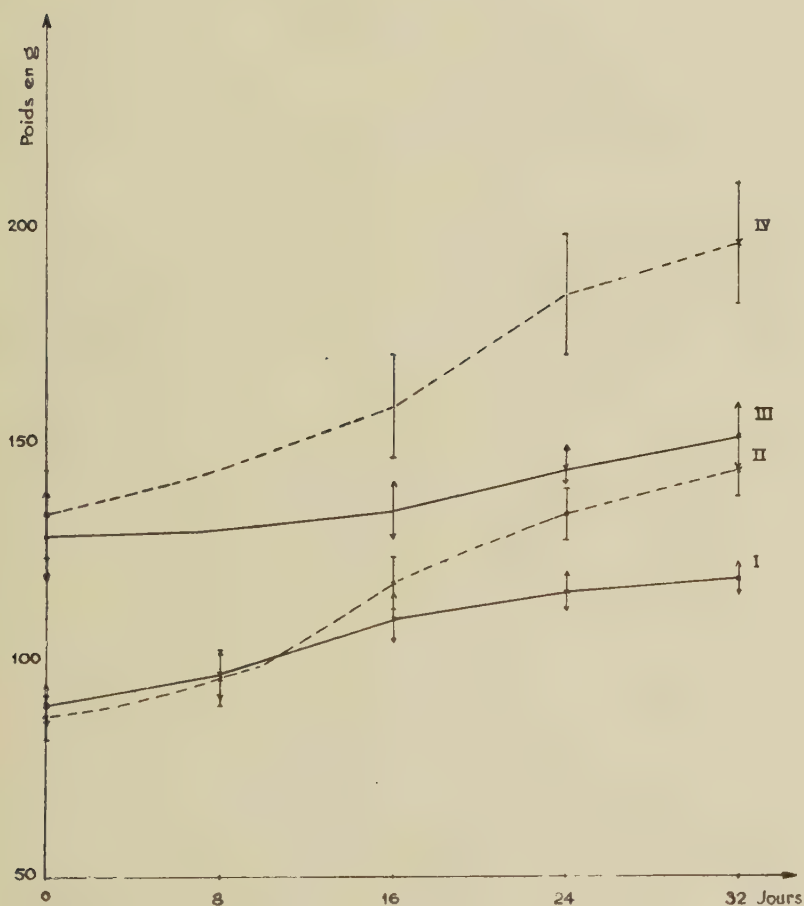


Fig. 7 : Evolution pondérale chez le rat

- a) — : Lots soumis à un régime carencé en pyridoxine.
b) ---- : Lots témoins recevant un régime synthétique équilibré.

— Les animaux n'ont jamais été atteints de crises épileptiformes. Cependant nous avons remarqué quelquefois des tremblements et une certaine parésie des membres postérieurs.

— L'enregistrement EEG chez le rat carencé, au cours du sommeil physiologique a permis de retrouver tous les stades observés chez le rat normal (fig. 8). Comme l'a déjà signalé KLEIN (115), on peut distinguer quatre états de vigilance :

a) un état d'hypervigilance qui correspond à l'agitation. Il est caractérisé par une activité corticale irrégulière à 8 c/s de 50 à 100 μ V. L'activité musculaire est très importante, le rythme cardiaque est élevé et le rythme respiratoire rapide et anarchique.

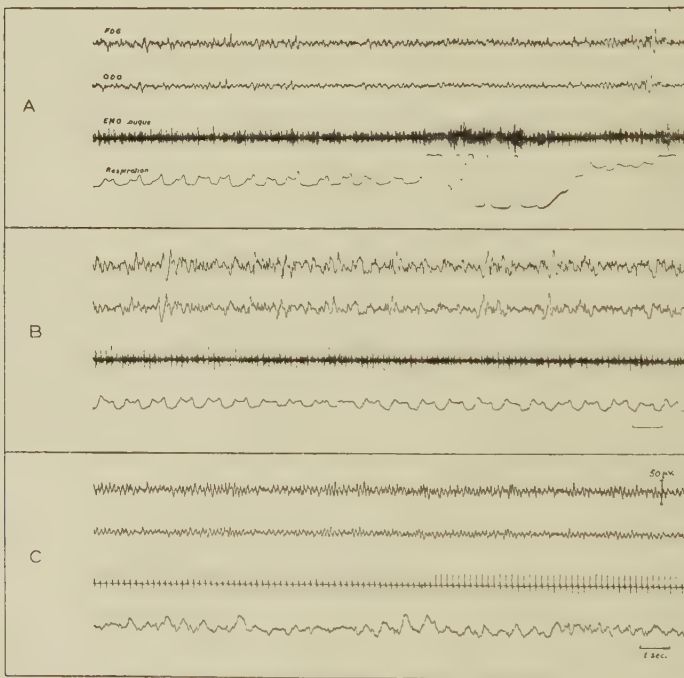


Fig. 8 : Etude polygraphique du sommeil chez le rat carencé en pyridoxine

A : Eveil.

B : Sommeil lent.

C : PRS.

b) un état d'éveil (fig. 8 A) qui est lié à une simple réaction d'éveil ou à un comportement d'investigation. Il apparaît alors une activité corticale à 8 c/s de 30 à 50 μ V ; l'activité musculaire est importante, le rythme cardiaque reste rapide et la respiration est plus régulière.

c) un état d'endormissement et de sommeil lent (fig. 8 B) caractérisé par l'apparition d'ondes lentes de haut voltage associées à des fuseaux à 13 c/s. L'activité musculaire diminue, le rythme cardiaque se ralentit et le rythme respiratoire se stabilise.

d) un état de sommeil rapide (fig. 8 C) caractérisé par une activité corticale similaire à celle de l'hypervigilance, très régulière, de 7 à 8 c/s, entrecoupée d'ondes de plus forte amplitude en fuseaux. L'activité tonique des muscles de la nuque disparaît, le rythme cardiaque se ralentit par rapport à la phase de sommeil lent et la respiration est irrégulière. Au point de vue comportemental, l'animal est atonique et étendu à plat sur le sol. On observe de nombreux mouvements des vibrisses, des oreilles, des pattes et de la queue. Les mouvements des yeux sont plus difficiles à observer.

La durée moyenne de cet état de sommeil est de 4 à 7 mn au maximum, et il se répète à intervalles de 5 à 10 mn environ.

Les enregistrements qui ont été effectués sur le rat carencé en pyridoxine, n'ont pas permis de mettre en évidence une différence significative dans la fréquence ou la durée de ces phases rapides de sommeil.

2. - Sur le plan biologique

Test de surcharge en L-Tryptophane.

— Caractérisation de l'acide xanthurénique dans les urines.

Test à l'alun ferrique en milieu tamponné.

Quatre semaines après le début de l'expérimentation, les urines des animaux soumis au régime carencé en pyridoxine, donnent des colorations vertes intenses correspondant à une forte excrétion d'acide xanthurénique. La réaction est négative pour les urines de rats témoins.

— Chromatographie sur papier des métabolites urinaires du L-Tryptophane.

En suivant la technique exposée dans le chapitre précédent nous avons retrouvé, dans les extraits d'urines de rats soumis à la carence en pyridoxine, les métabolites du thyptophane isolés par DALGLIESH (55).

Le tableau IV réunit les résultats obtenus.

Il n'en est pas de même pour les extraits d'urines de rats soumis au régime équilibré, comme le montre la figure 9.

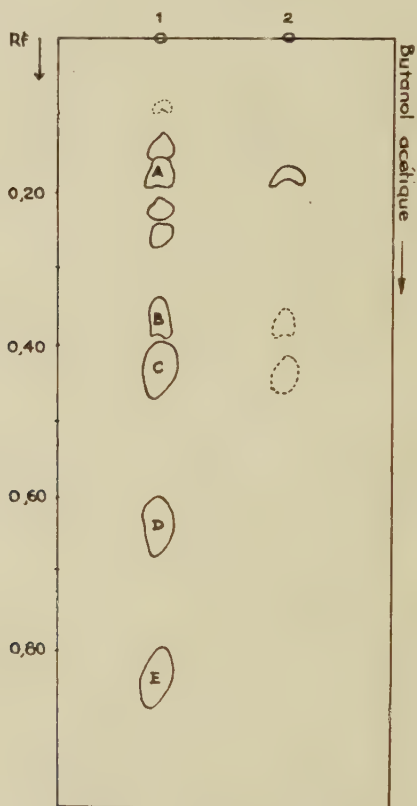


Fig. 9 : Chromatographie des dérivés urinaires du L-Tryptophane

1) Rats carencés en pyridoxine

2) Rats témoins

Identification des spots :

A Sulfate de 3 hydroxycynurénine

B 3 hydroxycynurénine

C Cynurénine

D Acides xanthurénique et cynurénique

E N-acétylcynurénine

Mesure du Rf	Fluorescence en U.V.	Réaction de EHRLICH	Réaction de PAULY	Test à l'alun ferrique	Identité probable *
—	—	—	—	—	—
0,09	Bleu-vert	Rose après quelques heures	—	—	Glycuronate de 3 hydroxy- cynurénine
0,13	Bleu violacé	—	—	—	
0,18	Bleu-vert	Jaune après qqes minutes	Brun rouge	—	Sulfate de 3 hydroxy- cynurénine
0,35	Vert-jaune	Rose après qqes minutes	Brun	—	3 hydroxy-cynurénine
0,42	Bleu pâle verdâtre	Orange immédiatement	—	—	Cynurénine
0,63	Bleu	—	Rouge	Vert	Acides xanthurénique et cynurénique
0,83	Bleu pâle	Jaune orangé immédiatement	—	—	N-acétyl-cynurénine

TABLEAU IV : Excrétion urinaire des métabolites du L tryptophane en avitaminose B₆

* **Identité probable** : La caractérisation de ces dérivés a été faite d'après les Rf fournis par la littérature (55-86). Au surplus ce problème était secondaire dans le cadre de notre travail.

D'une urine à l'autre nous observons quelques différences, mais les dérivés de la cynurénine et de l'hydroxycynurénine sont toujours présents dans les urines de rats en avitaminose B₆. Les urines de rats témoins contiennent vraisemblablement de petites quantités de cynurénine et d'hydroxycynurénine.

— Dosage de l'acide xanthurénique.

Les taux d'acide xanthurénique excrété, en fonction de la durée des essais, nous ont permis de déduire :

- le moment où est instaurée la carence en pyridoxine
- le degré de cette carence.

Les résultats que nous avons obtenus sont réunis dans le Tableau V et présentés sous la forme de graphique (fig. 10).

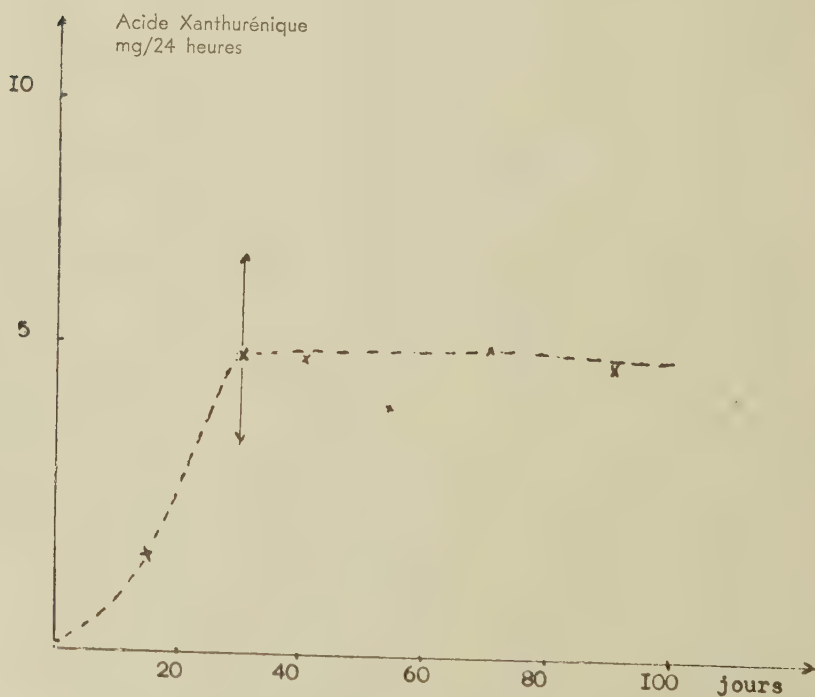


Fig. 10 : Elimination urinaire d'acide xanthurénique après surcharge en L-Tryptophane, chez les rats carencés en pyridoxine.

Nombre de jours de régime	Nombre d'animaux traités au tryptophane	Excrétion d'acide xanthurénique en mg/24 heures	
15	2	1,2 et 1,9	M = 1,5
30	4	3 - 4 - 4,4 et 7,5	M = 4,9
40	1	4,8	
55	2	3,7 et 5,3	M = 4,5
70	2	4,8 et 5	M = 4,9
90	1	4,7	

TABLEAU V : Excrétion d'acide xanthurénique chez les rats soumis à un régime carencé en pyridoxine, après surcharge en L-Tryptophane

D'après les tests de surcharge en L Tryptophane, nous constatons que la carence en pyridoxine est valable à partir du 30^e jour de régime de base. Nous avons poursuivi les essais au-delà de deux mois et il ne semble pas que la durée de l'expérience influe notablement sur l'élimination urinaire d'acide xanthurénique consécutive à une surcharge en L-Tryptophane. Cette élimination atteint une valeur maximale (moyenne 4,9 mg/24 h) au 30^e jour et se maintient ensuite sensiblement à ce niveau pendant plus de 3 mois.

II. — EFFETS DE LA CARENCE EN PYRIDOXINE SUR LA TENUEUR EN AMINO-ACIDES DU TISSU CÉRÉBRAL

1. - Chromatographie des amino-acides (fig. 11)

Localisation et identification des spots : les résultats de nos essais sont rassemblés dans le Tableau VI.

Nous n'avons pas dosé systématiquement, par colorimétrie après élution de chacun des spots du chromatogramme, les amino-acides ainsi révélés.

Nous avons simplement effectué une détermination semi-quantitative par comparaison de l'intensité et de la surface des taches obtenues.

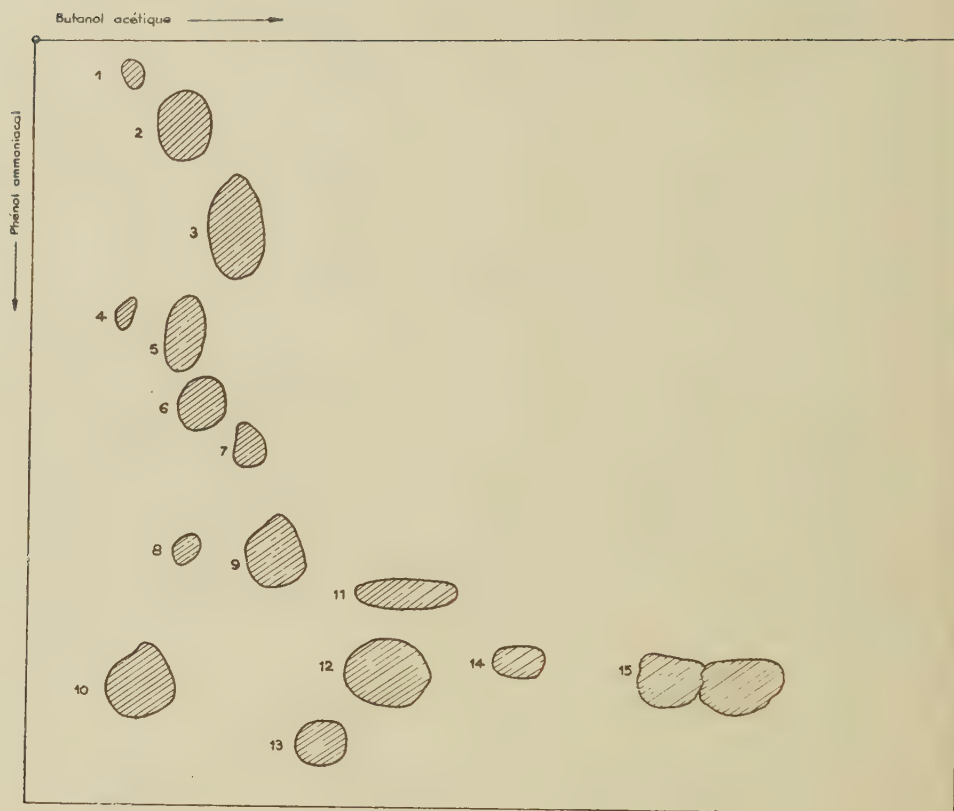


Fig. 11 : Chromatographie des acides aminés isolés du tissu cérébral chez le rat carencé ou non en pyridoxine.

Les résultats de nos essais d'identification des spots, sont donnés dans le Tableau VI.

Une telle « mesure » entraîne une erreur qui peut atteindre 15 %. Mais il nous a paru que des variations inférieures à ce taux seraient d'une interprétation difficile et par ailleurs, le nombre de dosages qu'il aurait fallu envisager ne nous a pas permis d'aborder autrement le problème quantitatif posé par tous les acides aminés.

Position des spots sur le chromatogramme	Valeur du Rf		Identité des acides aminés
	Solvant A*	Solvant B*	
1	0,05	0,10	Acide cystéique
2	0,11	0,16	Acide aspartique
3	0,25	0,21	Acide glutamique
4	0,30	0,08	Ethanol-amine phosphate
5	0,36	0,16	Sérine
6	0,43	0,18	Glycocolle
7	0,50	0,22	Thréonine
8	0,61	0,15	Glutamine
9	0,65	0,25	β -Alanine
10	0,80	0,11	Acides aminés basiques
11	0,68	0,39	Acide α -aminobutyrique
12	0,78	0,38	Acide γ -aminobutyrique
13	0,90	0,30	Proline
14	0,76	0,51	Valine
15	0,80	0,70	Leucine, Phénylalanine

TABLEAU VI : Lecture du chromatogramme d'acides aminés isolés du tissu cérébral de rats carencés ou non en pyridoxine (fig. 11).

Localisation et identification des spots.

Les chromatogrammes obtenus sur des échantillons de cerveaux appartenant à des rats carencés ou non sont apparemment identiques, sur les deux plans qualitatif et quantitatif ; pour des raisons pratiques et théoriques, nous n'avons dosé que l'acide gamma-aminobutyrique dans les extraits tissulaires.

2. - Dosage de l'acide gamma-aminobutyrique.

Plusieurs auteurs ayant mentionné une augmentation sensible du taux cérébral de GABA au cours de la croissance chez le lapin, la souris, l'embryon de poulet et le têtard de grosse grenouille (16-165-184), nous avons effectué des dosages parallèlement sur des rats de 15 jours environ dont le poids varie de 16 à 20 g,

* Solvant A : Phénol - eau (90 - 10) en présence d'un cristal de CNNa et de 100 ml d'une solution d'ammoniaque à 0,3 %.

* Solvant B : Butanol - acide acétique - eau (40 - 10 - 50).

et sur des rats adultes de même âge, répartis en deux lots homogènes, l'un carencé, l'autre soumis à un régime de base enrichi en pyridoxine.

Les résultats statistiques sont réunis dans le Tableau VII.

Comparaison des résultats :

— Ratons et rats normaux adultes

Le coefficient « t » de Student est égal à 10,3, valeur nettement supérieure à celle relevée dans la table de « t » à $P = 0,01$ pour un nombre de degrés de liberté égal à 17 (2,90).

	Ratons —	Rats normaux —	Rats carencés —
	1,78		2,48
	1,82	3,31	2,54
	1,97	3,10	2,52
	1,58	2,60	2,47
	1,94	2,68	2,06
	1,58	2,56	2,33
	1,91	2,85	2,50
	1,92	2,66	2,43
	1,70	2,68	2,24
	2		2,28
	1,72		2,08
			2,27
Moyenne $\bar{M}$	1,81	2,80	2,35
Ecart type = σ	0,150	0,266	0,166
Ecart type sur la moyenne = $\sigma m.$..	0,045	0,094	0,047
Valeur du « t » de Student pour une probabilité $P = 0,05$	2,226	2,36	2,20
Expression des résultats ($P = 0,05$)**	$1,81 \pm 0,10$	$2,80 \pm 0,22$	$2,35 \pm 0,10$

TABLEAU VII : Taux de GABA présent dans le cerveau chez le rat.

* Chaque dosage ayant été effectué en double à partir de l'extrait trichloracétique correspondant à un cerveau, nous donnons la moyenne des deux valeurs obtenues.

** Nous donnons dans ce tableau un exemple des calculs statistiques que nous avons utilisés pour présenter des résultats significatifs dans 95 % des cas. Nous avons effectué les mêmes calculs pour toutes les séries de mesures que nous avons été amenés à étudier au cours de notre travail expérimental. Dans les tableaux qui vont suivre nous nous bornerons à donner les résultats obtenus.

La différence des moyennes est donc hautement significative ; ces résultats confirment les données fournies par la littérature à ce sujet.

En ce qui concerne les taux de GABA chez le rat adulte normal, les résultats que nous avons obtenus sont sensiblement identiques à ceux de SANDMAN.

À titre de comparaison, nous avons rassemblé dans le Tableau VIII quelques valeurs fournies par d'autres auteurs utilisant des techniques de dosages différentes.

Références	Taux de GABA en μ moles/g de tissu frais
ANSELL et RICHTER (4)	2
CRAVIOTO et coll. (48)	2,42 à 4,37
VAN GELDER et ELLIOTT (195)	2,6 à 4
TURSKY et SAJTER (191)	2,74 $\pm$ 0,24
SANDMAN (172)	2,65 à 2,80
TSUJI et BALAGOT (190)	1,85 (cortex seulement)
BERL et WEALSH (23)	2 à 2,7 (cortex seulement)
BAXTER et ROBERTS (13)	2,52 à 2,60 (cortex seulement)

TABLEAU VIII : Teneur en GABA du tissu cérébral, chez le rat adulte : valeurs fournies par la littérature.

— Rats normaux et carencés

Nous avons constaté que les taux de GABA du cerveau subissent, chez les rats carencés, une baisse significative : le coefficient « t » de Student est égal à 4,75 (« t » = 2,88 pour $P = 0,01$ avec 18 degrés de liberté).

Cette baisse est de l'ordre de 16 % et semble confirmer les résultats obtenus in vitro à partir d'échantillons de cerveaux provenant d'animaux carencés en pyridoxine (134-167).

3. - Surcharge en phosphate de pyridoxal et taux d'acide gamma-aminobutyrique présents dans le cerveau chez les rats carencés ou non en pyridoxine.

Cet essai a été conduit parallèlement sur 8 rats témoins et sur 10 rats carencés.

D'après les résultats obtenus, qui sont présentés dans le Tableau IX, il paraît évident que la carence expérimentale en pyridoxine est bien responsable d'une diminution du taux de GABA chez le rat, puisque l'apport d'une surcharge en phosphate de pyridoxal permet de rétablir la concentration du tissu cérébral en cet amino-acide.

Lots	Nombre de rats traités	Phosphopyridoxal	Concentration moyenne
			de GABA en μ moles par g de tissu frais
Rats normaux ..	8	0	$2,80 \pm 0,22$
	8	200 μ g/rat	$2,45 \pm 0,14$
Rats carencés ..	12	0	$2,35 \pm 0,10$
	10	200 μ g/rat	$2,80 \pm 0,11$

TABLEAU IX : Effets d'une surcharge en phosphate de pyridoxal sur les taux de GABA présents dans le cerveau chez les rats carencés ou non en pyridoxine.

Par contre chez l'animal normal, une surcharge en phosphopyridoxal conduit à une diminution significative du taux de GABA. Cet effet a déjà été signalé chez la souris (140) ; il pourrait être dû à une activation importante par le phosphopyridoxal, de l'enzyme responsable de la transformation du GABA en demi-aldéhyde succinique dans son métabolisme oxydatif (Transaminase γ -amino-butyrique - α -cétoglutarique ou GABA-T).

III. — ACTION DE LA BUTYROLACTONE CHEZ LE RAT NORMAL OU CARENCÉ EN PYRIDOXINE

I. - Effets hypnogènes de la BL.

a) L'enregistrement EEG et polygraphique (muscle de la nuque et EKG), révèle que l'injection de 200 mg/kg de BL chez le rat normal ou carencé, entraîne, comme chez le rat intact pour cette dose (109), un état de narcose qui ne peut être comparé au sommeil physiologique (fig. 12). Parallèlement à la perte du réflexe de redressement de la tête, c'est-à-dire 4 à 5 minutes environ après l'injection du butyrolactone chez le rat normal, l'étude

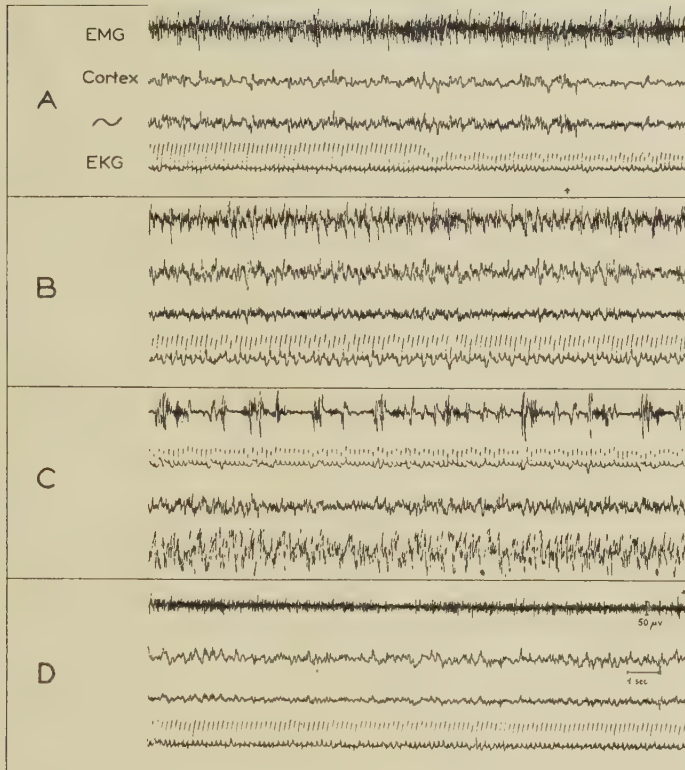


Fig. 12 : Action de la BL sur le tracé EEG et polygraphique (muscle de la nuque et EKG) chez le rat.

A : Sommeil physiologique puis réaction d'éveil.

B : Enregistrement obtenu 4 mn après l'injection de BL (200 mg/kg par voie intrapéritonéale) : apparition d'ondes lentes, de haut voltage.

C : Enregistrement obtenu 20 mn après l'injection de BL : le tracé évoque celui d'une narcose.

D : Eveil correspondant à la réapparition du réflexe de redressement de la tête.

polygraphique (fig. 12 B) révèle une activité corticale marquée par l'apparition d'ondes lentes de haut voltage. L'activité tonique des muscles de la nuque diminue considérablement, seuls persistent des mouvements rythmiques synchrones avec la respiration (fig. 12 C). Les rythmes cardiaques et respiratoires se ralentissent. Ce tracé évoque celui d'une narcose qui persiste pendant 45 minutes environ chez le rat normal. A aucun moment il n'apparaît de PRS et l'éveil correspond à la réapparition du réflexe de redressement de la tête.

Au point de vue comportemental, l'injection de 200 mg/kg de butyrolactone est suivie d'une diminution progressive de l'activité spontanée puis les réflexes de posture disparaissent et l'animal paraît dormir, mais les yeux restent ouverts. Des stimulations auditives peuvent entraîner un éveil comportemental sans qu'il apparaisse de variation EEG.

b) L'étude statistique du temps de latence et de la durée de l'état de narcose chez le rat carencé ou non, est résumée dans le Tableau X.

Lots	Durée moyenne	Durée moyenne
	de la latence, en minutes*	de la narcose, en minutes*
Rats normaux	5,3 $\pm$ 0,15	47,3 $\pm$ 2,84
Rats carencés	8,4 $\pm$ 1,01	33,5 $\pm$ 2,58

TABLEAU X : Effets de la butyrolactone chez le rat carencé ou non en pyridoxine.

Comparaison des résultats.

Avec les deux critères choisis, les différences des moyennes sont hautement significatives : le coefficient « t » de Student est de 5,25 pour le temps de latence et de 7,58 pour la durée de la narcose. Ces valeurs sont nettement supérieures à celle relevée dans la table de « t » à $P = 0,01$ pour un nombre de degrés de liberté de $80 = 2,64$.

Nous en déduisons que la carence en pyridoxine est responsable chez le rat, d'une augmentation du temps de latence et d'une diminution de la durée de la narcose induite par la butyrolactone.**

2. - Influence d'une surcharge en phosphate de pyridoxal.

Les résultats de ces essais qui ont porté sur 2 lots de 8 animaux, sont réunis dans le Tableau XI.

* Nombre d'animaux en expérience dans chaque lot = 44.
Probabilité $P = 0,05$.

** N.B. : Cet effet paraît, dans une certaine mesure, spécifique de la butyrolactone : en effet, une expérience conduite de la même façon sur des rats normaux et des rats carencés ayant reçu par voie intrapéritonéale 20 mg/kg de phénobarbital, ne nous a pas permis de mettre en évidence des modifications du temps de latence ou de la durée de la narcose chez les rats carencés ou non en pyridoxine. Nous avons constaté par ailleurs que, à la dose employée, le gardénal n'a pas des effets aussi réguliers que la butyrolactone.

Il n'a été observé aucune différence significative entre les moyennes, par l'administration préalable de phosphopyridoxal aux rats normaux. Par contre, chez les rats carencés le temps de latence est raccourci et la narcose prolongée dans des proportions significatives : le « t » de Student est égal à 2,14 pour le temps de latence et à 3,01 pour la narcose (« t » = 2,13 pour $P = 0,05$).

Lots	Nombre de rats traités	Phospho-pyridoxal	B. L	Durée moyenne de la latence en minutes*	Durée moyenne de la narcose, en minutes*
Rats normaux	8	0	200 mg/kg	$5,25 \pm 2,2$	$55 \pm 7,6$
	8	200 μ g/rat	200 mg/kg	$6,9 \pm 1$	$43,7 \pm 4,9$
Rats carencés	7	0	200 mg/kg	$10 \pm 2,9$	$33,5 \pm 8,2$
	8	200 μ g/rat	200 mg/kg	$7 \pm 1,47$	$45,75 \pm 8,7$

TABLEAU XI : Influence du phosphopyridoxal sur les effets de la butyrolactone (BL) chez le rat carencé ou non en pyridoxine.

Nous déduisons de ces résultats que la diminution des effets de la BL chez le rat, est bien liée à une carence expérimentale en pyridoxal, c'est-à-dire en un facteur indispensable à la transamination.

3. - Effets de la butyrolactone sur les taux de GABA présents dans le cerveau chez les rats carencés ou non en pyridoxine.

Les résultats sont réunis dans le Tableau XII.

Lots	Nombre de rats traités	B. L	Concentration moyenne de GABA en μ moles/g de tissu frais*
Rats normaux	8	0	$2,80 \pm 0,22$
	8	200 mg/kg	$2,45 \pm 0,23^{**}$
Rats carencés	12	0	$2,35 \pm 0,10$
	12	200 mg/kg	$2,12 \pm 0,11^{**}$

TABLEAU XII : Influence de la narcose à la bytyrolactone sur les taux de GABA présents dans le cerveau chez les rats carencés ou non en pyridoxine.

* Probabilité $P = 0,05$.

** Au lieu de traiter individuellement chaque cerveau, nous avons effectué des dosages sur des échantillons de deux cerveaux broyés ensemble. Le chiffre indiqué correspond à la moyenne des valeurs obtenues pour cet ensemble de dosages.

Il ressort de cet essai que l'effet narcotique de la BL n'est nullement lié à une augmentation du taux de GABA dans le cerveau ; nous avons constaté au contraire sous narcose, une baisse de la teneur du tissu cérébral en cet amino-acide, de l'ordre de 10 % chez l'animal carencé en pyridoxine et de 16 % chez l'animal normal.

Ces résultats doivent être rapprochés de ceux publiés par GIARMAN et SCHMIDT (78) qui ne constatent pas de modifications sensibles du taux cérébral de GABA, après administration de BL à la souris. D'autre part plusieurs auteurs ont signalé que l'anesthésie au penthiobarbital entraînait une faible diminution de la teneur en azote aminé du tissu cérébral (4) et une baisse du taux de GABA pouvant aller jusqu'à 30 % (190).

CHAPITRE III

DISCUSSION DES RÉSULTATS. ESSAIS D'INTERPRÉTATION

I. — VALIDITÉ DES TECHNIQUES ET DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES ADOPTÉES

1. - Réalisation de la carence en pyridoxine.

a) Espèce animale :

Nous avons déjà indiqué les raisons qui ont guidé notre choix. Nos propres essais confirment que le rat :

— se prête de façon relativement aisée, à la réalisation d'une carence en pyridoxine,

— permet d'étudier dans des conditions satisfaisantes le problème que nous nous sommes posé.

b) Régimes synthétiques :

L'emploi d'un régime synthétique, bien équilibré en principes énergétiques et carencé exclusivement en pyridoxine, conduit dans de bonnes conditions, en un temps relativement court chez le rat, à une avitaminose B₆. D'autre part, la constitution, pour chaque expérience, d'un lot témoin recevant le régime de base supplémenté en vitamine B₆, nous assure la possibilité de comparer au cours de l'essai, l'état des animaux recevant une alimentation enrichie ou non en pyridoxine. Ainsi seule la carence vitaminique B₆ peut être mise en cause dans les différences observées.

c) Contrôle de la carence :

L'étude comparée de la courbe pondérale des animaux et l'évolution des signes cliniques de l'avitaminose (dermatoses autour des pattes et du nez, troubles nerveux) permettent de suivre le développement de la carence.

Sans être d'une spécificité absolue, le dysmétabolisme du tryptophane constitue un test biochimique sensible et parfaitement valable pour évaluer une carence en vitamine B₆. D'ailleurs l'application de l'épreuve de surcharge en tryptophane aux animaux appartenant à des lots témoins, nous apporte la preuve qu'aucune perturbation ne se manifeste si le régime est supplémenté en pyridoxine.

Le temps nécessaire pour obtenir une telle carence chez le rat, nous a paru conforme aux données publiées par d'autres auteurs.

2. - Techniques de dosage des acides aminés.

L'isolement et la séparation chromatographique des acides aminés du cerveau chez les rats carencés ou non en pyridoxine présentent un intérêt sur le plan qualitatif. Par contre, il nous a paru difficile d'interpréter ces essais sur le plan quantitatif. Un dosage systématique de tous les amino-acides révélés sur le chromatogramme, par colorimétrie après élution de chacun des spots, ne pouvait être envisagé pour des raisons pratiques, cette technique se prêtant très difficilement à des dosages en série.*

Par contre, des considérations théoriques, ce qu'on sait de la localisation spécifique de l'acide 4-amino-butyrique dans le cortex, de son métabolisme et de son rôle éventuel dans les inhibitions nerveuses, nous ont incités à doser sélectivement cet amino-acide dans les extraits tissulaires cérébraux.

Sur le plan pratique un tel dosage est réalisable en série à l'aide d'une technique simple, spécifique et sensible. Elle ne nécessite, en effet, que l'emploi de petites colonnes à chromatographie et de résines commercialisées ; sa spécificité a été démontrée par

* Il eût été intéressant de doser tous les amino-acides isolés du tissu cérébral, à l'aide d'un auto-analyseur « Technicon » adapté à cet usage. Ne disposant pas d'un tel appareillage, nous regrettons de n'avoir pu résoudre le problème quantitatif posé par tous les acides aminés du cerveau.

chromatographie, et sa sensibilité nous a permis d'effectuer les dosages sur une partie aliquote d'extrait trichloracétique provenant d'un seul cerveau.

Au cours de la mise au point de cette technique de dosage, nous avons constaté, lors de l'extraction, des pertes de l'ordre de 20 % : il est toujours délicat de parler de mesure quantitative quand le mode opératoire conduit à une perte aussi importante. Nous pouvons affirmer toutefois que celle-ci est exactement compensée lorsque la solution témoin d'acide gamma-aminobutyrique est passée sur les résines, dans les mêmes conditions que l'extrait tissulaire ; en réalisant ainsi pour chaque détermination, une courbe d'étalonnage, à partir d'une solution titrée d'acide gamma-aminobutyrique, nous avons toujours obtenu des résultats parfaitement reproductibles, la précision étant d'environ $\pm 6\%$, ce qui nous a paru satisfaisant.

Nous avons trouvé ainsi des teneurs en acide gamma-aminobutyrique, chez le rat normal, de $2,8\ \mu$ moles par gramme de tissu cérébral frais. Cette valeur est comparable à celles mentionnées dans la littérature ($2,4$ à $4\ \mu$ moles par gramme de tissu frais).

Nos essais ayant été effectués sur des lots homogènes de 8 à 12 animaux carencés ou non, la précision du dosage nous a permis de considérer comme significative toutes différences supérieures à $0,16\ \mu$ mole par gramme de tissu frais.

3. - Action physiologique et pharmacologique de la butyrolactone :

— La narcose provoquée par l'injection intra-péritonéale de butyrolactone chez le rat a été objectivée par la perte et la réapparition du réflexe de redressement de la tête. Un contrôle par l'étude du tracé EEG et polygraphique (muscle de la nuque et EKG) a mis en évidence les effets parallèles de la butyrolactone sur les mouvements spontanés et sur l'activité corticale : la perte du réflexe de posture choisi, correspond à l'apparition d'ondes corticales lentes, de haut voltage, évoquant une narcose.

— A côté de cette action pharmacologique que nous avons mis en évidence, rappelons que, dans certaines conditions expérimentales*, la butyrolactone apparaît comme un précurseur pos-

* Chez le chat intact, à de faibles doses ($50\ \text{mg/kg}$).

Chez le chat décortiqué, ou après coagulation du noyau RPC.

sible de l'agent neuro-humoral capable de déclencher les phases rhombencéphaliques du sommeil.

Notre hypothèse de travail s'appuyait sur la mise au jour de cette action « physiologique » propre à la butyrolactone et sur l'analogie structurale permettant de relier BL et GABA. Ce dernier était-il l'agent neuro-humoral mis en cause et la butyrolactone pouvait-elle en être le précurseur? C'est ce dernier point que nous avons essayé de vérifier dans notre travail expérimental.

II. — RELATIONS ENTRE BUTYROLACTONE, VITAMINE B₆ ET ACIDE GAMMA-AMINOBUTYRIQUE

Il a été démontré que la carence en vitamine B₆ n'exerce chez le rat aucune influence sur les caractéristiques de l'électrocortico-gramme. Les phases rapides de sommeil, notamment, sont identiques, en fréquence et en durée, à celles observées chez l'animal normal. Il semblerait donc que les effets neurologiques de l'apyridoxinose ne se manifestent pas au niveau des structures nerveuses (formation réticulée pontique) responsables de cet état de sommeil. Par ailleurs la carence en pyridoxine est bien responsable d'une diminution du taux d'acide 4-aminobutyrique chez le rat, puisque nous avons vérifié qu'une surcharge en phosphate de pyridoxal permet de rétablir la concentration du tissu cérébral en cet amino-acide. Toutefois cette avitaminose B₆ expérimentale a, sur le taux d'acide 4-amino-butyrique du cerveau chez le rat, des effets limités. Les différences observées entre animaux témoins et carencés sont certes significatives : elles ne représentent cependant chez les carencés qu'une diminution de l'ordre de 16 % des teneurs en acide gamma-aminobutyrique du tissu cérébral.

Ces résultats s'expliquent si l'on admet que :

— l'avitaminose créée expérimentalement par un régime carencé en pyridoxine n'est sans doute que partielle, en dépit de la validité des tests de contrôle utilisés,

— les facteurs de transamination ne sont pas les seuls à intervenir dans le métabolisme de l'acide gamma-aminobutyrique ; il peut être également synthétisé par d'autres voies, notamment à partir de la proline (181).

Il résulte de nos expériences que les phases rhombencéphaliques du sommeil ne sont pas directement sous la dépendance quantitative de l'acide gamma-aminobutyrique présent dans le cerveau chez le rat.

Il a été trouvé enfin que l'action dépressive centrale de la butyrolactone déterminée sous contrôle EEG par la durée de la narcose et du temps de latence qui précède, était liée dans une certaine mesure à l'apport ou à la carence en vitamine B₆ dans le régime ; mais contrairement à ce que l'on pouvait penser à priori, la narcose à la butyrolactone s'accompagne non d'une augmentation des taux d'acide gamma-aminobutyrique, mais plutôt d'une baisse de l'ordre de 10 % chez l'animal carencé et de 16 % chez l'animal normal.

III. — RECHERCHES D'UN MÉCANISME POSSIBLE DE L'ACTIVITÉ DE LA 4-BUTYROLACTONE

Les données expérimentales que nous venons de discuter sont apparemment contradictoires. Tout au moins peut-on dire qu'elles ne cadrent pas avec notre hypothèse de travail. Il semble en effet impossible à la lumière de nos résultats, de considérer la butyrolactone comme un précurseur éventuel de l'acide gamma-aminobutyrique. Une telle conclusion résulte également des recherches poursuivies parallèlement aux nôtres par GIARMAN et SCHMIDT (78).

Tenant de préciser le mécanisme de l'action centrale de la butyrolactone, ces auteurs ont cru pouvoir relier ses effets à une augmentation des taux d'acétylcholine ou de dérivés cholinergiques présents dans le tissu cérébral.

L'activité cholinergique d'extraits de cerveaux de souris et de rats sacrifiés sous narcose à la butyrolactone a été déterminée sur organes isolés, segment d'iléon de cobaye et muscle abdominal de grenouille. Dans ces conditions expérimentales, les auteurs ont noté par rapport à des préparations témoins, une augmentation du taux cérébral « d'acétylcholine » dont les variations sui-

vent l'évolution de l'état dépressif ; une élévation maximale de l'ordre de 44 % a pu être enregistrée 15 minutes après l'injection de butyrolactone (750 mg/kg chez la souris par voie intra-péritonéale) et notamment au niveau du cortex et du corps quadrijumeau.

De telles variations paraissent certes significatives mais les substances cholinergiques présentes dans ces extraits tissulaires, n'ont été dosées (rapportées à une concentration en acétylcholine), qu'en fonction de la réponse obtenue sur un organe isolé et il semble difficile, dans ces conditions, d'admettre sans quelques réserves l'interprétation qu'ont cru pouvoir déduire GIARMAN et SCHMIDT (78) de ces données expérimentales.

C'est ce qui nous a incités à reprendre cette étude.

Nous avons vérifié que la 4-butyrolactone était dépourvue d'effet contracturant, *in vitro*, sur les fibres intestinales isolées (iléon de cobaye, duodénum de rat) même à une très forte concentration dans le milieu nutritif (3×10^{-4}). Cependant, si on détermine la réactivité de la fibre intestinale à l'acétylcholine avant et après addition de butyrolactone, on observe, après introduction de la lactone dans le bac, une nette potentialisation des effets de l'acétylcholine (fig. 13). Suivant les essais, le pouvoir contracturant d'une même dose d'acétylcholine est multiplié par un facteur de 1,5 à 2.

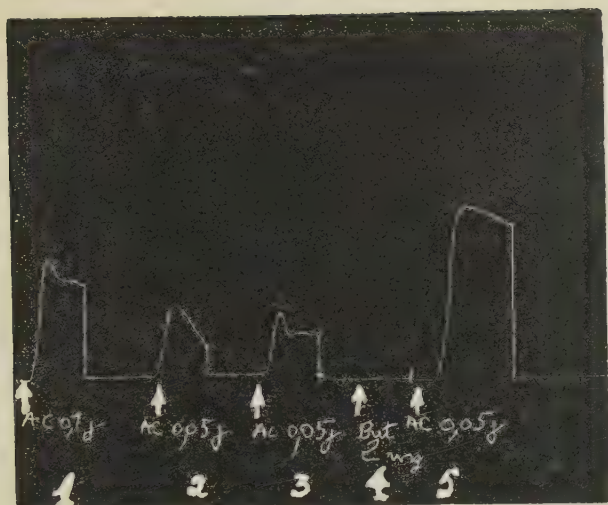
Comment expliquer cette action ?

Il ne semble pas possible de retenir une inhibition des cholinestérases par la butyrolactone : sur la fibre éserinée, on observe encore, quoique de façon moins nette, une potentialisation de l'acétylcholine par la lactone.

Mais d'autres mécanismes peuvent être envisagés, notamment celui qui a été proposé pour rendre compte de l'activité cholinergique des dérivés xanthiques tels que la caféine.

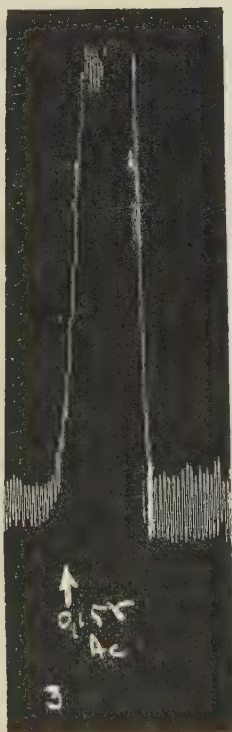
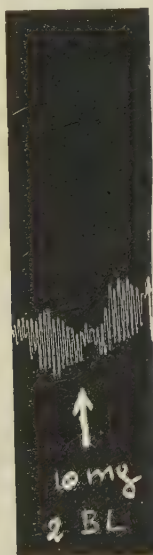
Selon BACQ (9), en effet, cette propriété serait liée à une augmentation de la perméabilité cellulaire aux ions K^+ dont on sait qu'ils sensibilisent les fibres lisses à l'action de l'acétylcholine.

Nous avons cherché à objectiver une telle propriété en étudiant *in vitro* la vitesse de passage des ions alcalins du milieu cellulaire dans les espaces extra-cellulaires.



A) Ileón de cobaye :

- 1 - Acétylcholine 0,1 μ g
- 2 - 3 - Acétylcholine 0,05 μ g
- 4 - Butyrolactone 2 mg
- 5 - Acétylcholine 0,05 μ g



B) Duodénum de rat :

- 1 - Acétylcholine 0,15 μ g
- 2 - Butyrolactone 10 mg
- 3 - Acétylcholine 0,15 μ g

Fig. 13 : Effets de la butyrolactone sur organe isolé.
Potentialisation de l'action contracturante de l'acétylcholine.

Nous avons réalisé cet essai sur des hématies dans les conditions suivantes :

Prélevé par ponction cardiaque (chat*) sur une goutte d'héparine, le sang est immédiatement centrifugé et les hématies lavées à trois reprises à l'aide d'un soluté isotonique de glucose (5 fois environ le volume globulaire recueilli). On opère ensuite comme pour la détermination de la résistance globulaire, des solutés de glucose, de concentrations comprises entre 50 et 10 g par litre, étant substitués aux solutions de chlorure de sodium (0,5 ml de la suspension globulaire lavée pour 5 ml de soluté). Les galeries de tubes sont portées au préalable à 37° C et la suspension globulaire diluée est centrifugée rapidement à grande vitesse 5 minutes après addition des hématies. Les ions alcalins sont dosés dans le surnageant par spectrophotométrie de flamme et les concentrations trouvées sont exprimées en pourcentages des taux déterminés dans le tube contenant le soluté à 10 g par litre dans lequel l'hémolyse totale est toujours observée immédiatement.

En comparant, dans des conditions expérimentales strictement identiques, les taux de sodium et de potassium présents dans des solutés de glucose additionnés ou non de butyrolactone (1 %), il est possible de mettre en évidence l'influence éventuelle de ce composé sur la vitesse de passage des ions alcalins à travers la membrane de l'hématie.

Les moyennes des résultats obtenus au cours de 4 essais sont présentées sous forme de graphiques (fig. 14). L'examen de ces courbes montre que les deux cations alcalins passent l'un et l'autre beaucoup plus vite dans le milieu extérieur lorsque le soluté est additionné de butyrolactone.

D'autres essais ont été effectués dans les mêmes conditions avec des hématies de rat et l'action de la butyrolactone a été comparée à celle de la caféine (1 %).

Les hématies de rat contiennent surtout du potassium et seul ce cation a été dosé dans le soluté glucosé. Les résultats obtenus sont du même ordre : les teneurs en potassium sont augmentées de façon significative, moins cependant en présence de caféine que de butyrolactone.

* Les hématies de chat sont particulièrement riches en sodium, et il est possible ainsi de suivre simultanément le passage des ions K^+ et Na^+ à travers la membrane hématique.

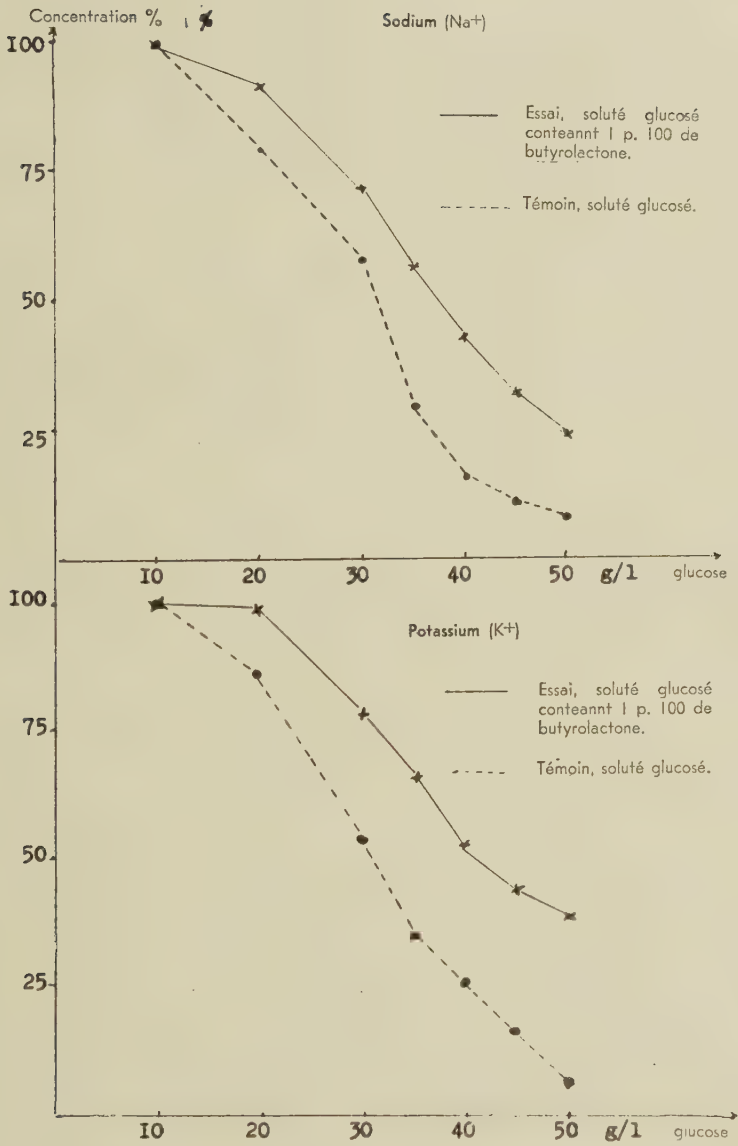


Fig. 14 : Modification de la perméabilité cellulaire par la butyrolactone. Etude sur les hématies de chat, en suspension dans un soluté de glucose à diverses concentrations.

On peut donc penser que l'augmentation des taux de substances cholinergiques observée par GIARMAN et SCHMIDT dans les extraits de tissu cérébral chez des rats traités par de très fortes doses de butyrolactone est liée, au moins partiellement, à la présence de ce composé dans les solutions extractives et par là à une modification de la perméabilité des membranes au transmetteur cholinergique.

Mais les données expérimentales que nous venons de rapporter ne permettent pas, pour autant, d'expliquer le mode d'action de la 4-butyrolactone au niveau du cortex et, plus précisément, au niveau des centres responsables du déclenchement des phases rapides de sommeil. Nous souhaitons simplement qu'elles soient à l'origine d'une nouvelle hypothèse de travail.

CONCLUSIONS

— L'étude polygraphique du sommeil chez les rats carencés ou non en pyridoxine n'a pas permis de mettre en évidence une variation significative dans la fréquence ou la durée des phases rhomboencéphaliques du sommeil.

— Facteur enzymatique intervenant dans les processus de transamination, la pyridoxine joue un rôle certain, encore que limité, dans le métabolisme cérébral de l'acide gamma-amino-butyrique ; chez les animaux carencés, la teneur du cerveau en cet amino-acide accuse une baisse de l'ordre de 16 %.

A la lumière de ces résultats, il semble donc difficile d'admettre que les états de sommeil rapide soient directement sous la dépendance quantitative de l'acide gamma-aminobutyrique présent dans le cerveau.

— Capable dans certaines conditions expérimentales d'induire les phases rapides de sommeil, la butyro-lactone est douée, chez l'animal intact, d'effets narcotiques. Ceux-ci dépendent dans une certaine mesure de l'intégrité du métabolisme cérébral, tout au moins en ce qui concerne le rôle joué par la pyridoxine. Il a été observé en effet chez les rats carencés en vitamine B₆, à la fois une augmentation du temps de latence (+ 58 %) et une diminution de la durée de la narcose (— 29 %).

Cependant, chez tous les animaux, carencés ou non, l'administration de butyrolactone provoque une baisse légère et non une augmentation de la teneur en acide gamma-aminobutyrique du tissu cérébral.

— Certains des mécanismes possibles de l'action centrale de la butyrolactone ont été envisagés ; il semble que ce composé soit capable de modifier la perméabilité cellulaire, notamment aux ions alcalins, sodium et potassium, et par là-même de renforcer les effets des substances actives au niveau des effecteurs.

Vu et approuvé :

Le Doyen,

J.F. CIER

Le Président de la Thèse,

A. CIER.

Vu et Permis d'imprimer.

LYON, le 5 Mars 1965

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université,

P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

1. ACKERMANN (D.) und KUTSCHER (F.R.). — Über Aporrhegmen. Z. Physiol. Chem., 1910, **69**, 1265-1272.
2. ALBERS (R.W.), KOVAL (G.), Mc KHANN (G. and RICKS (D.). — Quantitative studies of in vivo γ aminobutyrate metabolism, p. 340-347 in: « The regional chemistry, physiology and pharmacology of the nervous system ». Proceedings of the Fourth International Neurochemical Symposium. Varenna. Italy.
KETY (S.S.) and ELKES (J.). — Ed. Pergamon Press. Oxford. London. New-York. Paris, 1961.
3. AMIN (A.H.), CRAWFORD (T.B.B.) and GADDUM (J.H.). — The distribution of substance P and 5-hydroxy-tryptamine in the central Nervous System of the Dog. J. Physiol. G.-B., 1954, **126**, 596.
4. ANSELL (G.B.) and RICHTER (H.). — A note on the free amino-acid content of rat brain. Biochem. J., 1954, **57**, 70-73.
5. AWAPARA (J.), LANDUA (A.J.), FUERST (R.) and SEALE (B.). — Free gamma-aminobutyric acid in brain. J. Biol. Chem., 1950, **187**, 35-39.
6. AXELROD (J.). — O-metylation of adrenaline and other catechols in vitro and in vivo. Science, 1957, **126**, 400-401.
7. AXELROD (J.). — Presence, formation and metabolism of normetanephrine in the brain. Science, 1958, **127**, 754-755.
8. AXELROD (J.), WEIL-MALHERBE (H.) and TOMCHICK (R.). — The physiological disposition of adrenaline-I and its metabolite metanephrine-I. J. Pharmacol. Exper. Therap., 1959, **127**, 251-255.
9. BACQ. — Pharmacodynamie Biochimique. Masson, éd., Paris, 1954, p. 166.

10. BAIN (J.A.) and WIEGANG (R.G.). — Hydrazide convulsions and vitamin B₆ analogues in mouse brain. *J. Pharmacol. Exper-Therap.*, 1957, **119**, 131-134.
11. BAIRD (D.) and COURSIN (D.B.). — Present status of vitamin B₆ metabolism. *Amer. J. Clin. Nutrit.*, 1961, **9**, 304-314.
12. BALZER (H.), HOLZ (P.) and PALM (D.). — Untersuchungen über die biochemischen Grundlagen der konvulsiven Wirkung von Hydraziden. *Arch. Exper. Pathol. u. Pharmakol.*, 1960, **239**, 520-552.
13. BAXTER (C.E.) and ROBERTS (E.). — The elevation of gamma-aminobutyric acid in rat brain, with hydroxylamine. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1959, **101**, 811-815.
14. BAXTER (C.F.) and ROBERTS (E.). — The elevation of 4-aminobutyric acid in rat brain with hydroxylamine in : « Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid ». ROBERTS (E.) Ed. : Pergamon Press. Oxford. London. New-York. Paris, 1960, p. 358-364.
15. BAXTER (C.F.) and ROBERTS (E.). — 4-aminobutyric acid and cerebral metabolism in : « The neurochemistry of nucleotides and amino-acids ». BRADY (R.O. and TOWER (D.B.) Eds : WILEY in. N.Y., 1960, p. 127-145.
16. BAXTER (C.F.), SHADE (J.P.) and ROBERTS (E.). — Maturational changes in cerebral cortex. II : Levels of glutamic acid, de carboxylase, gamma-aminobutyric acid and some related amino-acids. in « Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid ». ROBERT (E.) Ed. Pergamon. Press. Oxford. London. New-York. Paris, 1960, p. 214-218.
17. BAZEMORE (A.W.), ELLIOTT (K.A.C.) and FLOREY (E.). — Isolation of Factor I. *J. Neurochem.*, 1957, **1**, 334-339.
18. BENDA (P.), DESHAIES (G.), PERLES (R.), DESHAIES-PELLIER (S.) et ROSENBERGER-DESBIESSE (J.). — Premier essai de la butyrolactone en clinique. *Am. Med. Psychol.*, 1960, n° 4, 1-6.
19. BENDA (P.) et PERLES (R.). — Etude expérimentale de l'abaissement de la vigilance par la 4-butyrolactone. *C.R. Acad. Sci.*, 1960, **251**, n° 13, 1312-1313.
20. BENDA (P.) et PERLES (R.). — Mise en évidence des effets convulsivants des α -hydroxy, $\beta\beta$ -diméthyl, γ -butyrolactones (pantolactones). *C.R. Acad. Sci.*, 1961, **252**, 359-361.

21. BERL (S.), PURPURA (D.P.), GONZALEZ-MONTEAGUDO (O.) and WEALSCH (H.). — Effects of injected amino-acids on metabolic changes occurring in epileptogenic and nonepileptogenic lesions of the cerebral cortex in: « Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid », ROBERTS (E.) Ed. Pergamon Press, Oxford. London. New-York. Paris, 1960, pp. 445-453.
22. BERL (S.), TAKAGAKI (G.) and PURPURA (D.P.). — Metabolic and pharmacological effects of injected amino-acids and ammonia on cortical epileptogenic lesions. *J. Neurochem.*, 1961, **7**, 198-209.
23. BERL (S.) and WAELSCH (H.). — Determination of glutamic acid, glutamine, glutathione and gamma-aminobutyric acid and their distribution in brain tissue. *J. Neurochem.*, 1958, **3**, 161.
24. BERTLER (A.). — Occurrence and localization of catecholamines in the human brain. *Acta Physiol. Scand.*, 1961, **51**, 97-107.
25. BERTLER (A.) and ROSENGREN (E.). — Distribution of mono-amines and enzymes responsible for their formation in brain. *Experientia*, 1959, **15**, 382-384.
26. BESSMAN (S.P.) and SKOLNIK (S.J.). — Gamma-hydroxybutyrate and gamma-butyrolactone concentration in rat tissues during anesthesia. *Science*, 1964, **143**, 1045-1047.
27. BINDMAN (L.J.), LIPPOLD (O.C.J.) and RED FEARN (J.W.T.). — The non selective blocking action of gamma-aminobutyric acid on the sensory cerebral cortex of the rat. *J. Physiol. G. B.*, 1962, **162**, 105-120.
28. BISERTE (G.), BOULANGER (P.) et PAYSAN (P.). — Chromatographie sur papier des acides aminés et des polypeptides des milieux biologiques. VI : Tissus normaux et pathologiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, **40**, 2067-2089.
29. BLASHKO (H.). — Metabolism of mediator substances in « Psychotropic Drugs ». Elsevier Ed., Publish. Comp. Amsterdam, 1957, pp. 3-9.
30. BOGDANSKI (D.F.), WEISSBACH (H.) and UDENFRIEND (S.). — The distribution of serotonin, 5-hydroxytryptophan decarboxylase and mono-amine oxidase in brain. *J. Neurochem.*, 1957, **1**, 272-278.

31. BRADLEY (P.B.). — Electrophysiological evidence relating to the role of adrenaline in the central nervous system, in « Ciba Foundation symposium on Adrenergic mechanisms ». Vane Ed., London, 1960, pp. 410-420.
32. BREMER (F.). — Médiateurs chimiques et activités nerveuses centrales chez les Vertébrés, in « Actualités Pharmacologiques ». Masson Ed., Paris, 1957, **10**, pp. 25-45.
33. BRODIE (B.B.). — Hormones, brain function and behaviour. Academic Press, Inc. New-York, 1957, pp. 146-154.
34. BRODIE (B.B.) and LIPMANN (F.). — Identification of a gluconolactonase. J. Biol. Chem., 1955, **212**, 677-685.
35. BRODIE (B.B.), OLIN (J.S.), KUNTZMAN (R.G.) and SHORE (P.A.). — Possible interrelation between release of brain norepinephrine and serotonin by reserpine. Science, 1957, **125**, 1293-1294.
36. BRODIE (B.B.) and SHORE (P.A.). — A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. Ann. New-York. Acad. Sci., 1957, **66**, 631-642.
37. BURNS (J.J.). — Missing step in man, monkey and guinea-pig required for the biosynthesis of L-ascorbic acid. Nature, 1957, **180**, 553-555.
38. CARLSSON (A.). — Occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. Pharmacol. Rev., 1959, **11**, 490-493.
39. CARLSSON (A.), FALCK (B.) and HILLARP (N.A.). — Cellular localization of brain mono-amines. Acta Physiol. Scand., 1962, **56**, Suppl. 196, 28 pp.
40. CHATTERJEE (I.B.), CHATTERJEE (G.C.) GHOSH (N.C.) and GUHA (B.C.). — Biological synthesis of ascorbic acid in animal tissues : conversion of L-gulonolactone into L-ascorbic acid. Biochem. J., 1960, **74**, 193-203.
41. CHATTERJEE (I.B.), CHATTERJEE (G.C.), GHOSH (N.C.), GOSH (J.J.) and GUHA (B.C.). — Biological synthesis of L-ascorbic acid in animal tissues : conversion of D-gluconolactone and L-gulonolactone into L-ascorbic acid. Biochem J., 1960, **76**, 279-292.

42. CIER (A.), JOUVET (M.), DUBROCARD (S.) et MICHEL (F.). — 4-butyrolactone et carence en pyridoxine chez le rat. C.R. Soc. Biol., 1963, **157**, 1600-1602.
43. CIER (A.), NOFRE (C.) et WELIN (L.). — Action des ultra-sons sur les acides aminés en solution aqueuse. Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, **43**, 1229-1236.
44. COLOWICK (S.P.) and KAPLAN (N.O.). — Methods in Enzymology II. Acad. Press. inc. New-York, 1955, p. 273.
45. CORI (O.) and LIPMANN (F.). — The preliminary oxydation product of enzymatic glucose-6-PO₄ oxidation. J. Biol. Chem., 1952, **194**, 417-425.
46. COSTA (E.), RINALDI (F.) and HIMWICH (H.E.). — Some relationships between tranquilization indol alkylamines and brain structure in « Phychotropic Drugs ». Elsevier Ed. Publish. Comp. Amsterdam, 1957, pp. 21-25.
47. CRASTES (A.), de PAULET (A.) et PETIT (R.). — Effet du L-Tryptophane sur la carence en vitamine B₆ provoquée par l'isoniazide. C. R. Soc. Biol., 1960, **154**, 161-165.
48. CRAVIOTO (R.O.), MASSIEU (G.) and IZQUIERDO (J.J.). — Free amino-acids in rat brain during insulin shock. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1961, **78**, 856-858.
49. CROSSLAND (J.) and MERRICK (A.J.). — The effect of anesthesia on the acetylcholine content of the brain. J. Physiol. G.B., 1954, **125**, 56-66.
50. CROUT (J.R.), CREVELING (C.R.) and UDENFRIEND (S.). — Norepinephrine metabolism in rat brain and heart. J. Pharmacol. Exper. Therap., 1961, **132**, 269-277.
51. CURTIS (D.R.) and DAVIS (R.). — Central action of 5-hydroxytryptamine and noradrenaline. Nature, 1961, **192**, 1083-1086.
52. CURTIS (D.R.), PHILLIPS (I.W.) and WATKINS (J.C.). — The depression of spinal neurones by gamma-aminobutyric acid and beta-alanine. J. Physiol. G.B., 1959, **146**, 185-203.

53. CURTIS (D.R.) and WATKINS (J.C.). — Investigations upon the possible synaptic transmitter function of gamma-aminobutyric acid and naturally occurring Amino-acids, in « Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid ». Roberts (E.) Ed. Pergamon Press. Oxford. London. New-York. Paris, 1960, p. 424-444.
54. DALE (H.H.). — Transmission of nervous effects of acetylcholine. Harvey Lectures, 1937, **32**, 229-235.
55. DALGLIESH (C.E.). — Pyridoxin and tryptophan metabolism. *Biochem. J.* 1952, **52**, 3-14.
56. DASGUPTA (S.R.), KILLAM (E.K.) and KILLAM (K.F.). — Drug action on rhinencephalic seizure activity in the cat. *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 1958, **122**, 16 a.
57. DELL (P.), BONVALLET (M.) et HUGUELIN (A.). — Tonus sympathique, adrénaline et contrôle réticulaire de la motricité spinale. *Electro-encephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1954, **6**, 599-618.
58. DOMER (F.R.) and FELDBERG (W.). — Tremor in cats : the effect of administration of drugs into the cerebral ventricles. *Brit. J. Pharmacol.*, 1960, **15**, 578-587.
59. EIDELBERG (E.), BAXTER (C.F.), ROBERTS (E.) and SALDIAS (C.A.). — Anticonvulsant properties of hydroxylamine and elevation of cerebral gamma-aminobutyric acid, in « Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid. Roberts (E.) Ed. Pergamon. Press. Oxford. London. New-York. Paris, 1960, p. 365-370.
60. ELLIOTT (K.A.C.). — Gamma-aminobutyric acid, an inhibitory factor in brain, in : « Biochemistry in the central Nervous System ». Proceedings of the fourth international Congress of Biochemistry Symposium. Brucke Ed. Pergamon Press. London, 1958, Vol. 3, p. 251-267.
61. ELLIOTT (K.A.C.) and FLOREY (E.). — Factor I. Inhibitory factor from the brain. Essay conditions in brain, stimulating and antagonizing substances. *J. Neurochem.* 1956, **1**, 181-185.
62. ELLIOTT (K.A.C.) and JASPER (H.H.). — Gamma-aminobutyric acid. *Physiol. Rev.*, 1959, **39**, 383-406.

63. ELLIOTT (K.A.C.) and LOVELL (R.). — The gamma-aminobutyric acid and Factor I content of brain. *Feder. Proc.*, 1962, **21**, 364-369.
64. EULER (U.S.V.). — Specific sympathomimetic ergone in adrenergic nerve fibres (sympathin) and its relation to adrenaline and nor-adrenaline. *Acta Physiol. Scand.*, 1956, **12**, 73-97.
65. EULER (U.S.V.) and GADDUM (J.H.). — Unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol.*, 1931, **72**, 74-87.
66. EVERETT (G.M.), WIEGAND (R.G.) and RINALDI (F.). — Pharmacologic studies of some nonhydrazine MAO inhibitors. *Ann. New-York Acad. Sci.*, 1963, **107**, 1068-1080.
67. FELDBERG (W.). — Acetylcholine, in «Metabolism of the Nervous System». Richter Ed. Pergamon Press. London, 1957, p. 493-510.
68. FELDBERG (W.) and SHERWOOD (S.L.). — Injections of drugs into the lateral ventricle of the cat. *J. Physiol. G.B.*, 1954, **123**, 148-167.
69. FELDBERG (W.) and SHERWOOD (S.L.). — Injections of bulbo-capnine into cerebral ventricles of cats. *Brit. J. Pharmacol.*, 1955, **10**, 371-374.
70. FELDBERG (W.) and VOGT (M.). — Acetylcholine synthesis in different regions of central nervous system. *J. Physiol. G.B.*, 1958, **107**, 372-381.
71. FISHBEIN (W.N.) and BESSMAN (S.P.). — Gamma-hydroxybutyrate in mammalian brain. *J. Biol. Chem.*, 1964, **239**, 357-361.
72. FLOREY (E.). — Über einen nervösen Hemmungsfaktor, in Gehirn und Rückenmark. *Naturwiss.*, 1953, **40**, 413.
73. FLOREY (E.). — Physiological evidence for naturally occurring inhibitory substances, in : «Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid». Roberts (E.) Ed. Pergamon Press. Oxford. London, New-York. Paris, 1960, p. 72-84.
74. FLOREY (E.). — A new test preparation for bioassay of Factor I and gamma-aminobutyric acid. *J. Physiol. G.B.*, 1961, **156**, 1-7.

75. GAMMON (G.D.), GUMNIT (R.), KAMRIN (R.P.) and KAMRIN (A.).
— Effects of convulsant doses of analeptic agents upon the concentration of amino-acids in brain tissue, in : « Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid ». Roberts (E.). Ed. Pergamon Press, London, 1960, p. 328-330.
76. GIARMAN (N.J.). — Antibiotic lactones and synthetic Analogs. Thesis for the Ph. D. degree at Yale University, 1948.
77. GIARMAN (N.J.) and ROTH (R.H.). — Differential estimation of gamma-butyrolactone and gamma-hydroxybutyric acid in rat blood and brain. Science, 1964, **145**, 583-584.
78. GIARMAN (N.J.) and SCHMIDT (K.F.). — Some neurochemical aspects of the depressant action of gamma-butyrolactone on the central nervous system. Brit. J. Pharmacol., 1963, **20**, 563-568.
79. GLAZER (H.S.), MUELLER (H.), THOMPSON (J.), HAWKINS (I.) and VILTER (L.). — Study of urinary excretion of xanthurenic acid and others tryptophan metabolites in human beings with pyridoxine deficiency induced by deoxypyridoxine. Arch. Biochem., 1951, **33**, 243-248.
80. GOLDRING (S.) and O'LEARY (J.L.). — Pharmacological dissolution of evoked cortical potentials. Feder. Proc., 1960, **19**, 612-614.
81. GONNARD (P.) et FENARD (S.). — Decarboxylase glutamique et hydrazones de phospho-5-pyridoxal. J. Neurochem, 1962, **9**, 135-142.
82. GOULD (R.G.). — Biosynthesis of cholesterol, in : « Cholesterol ». Cook (R.) Ed. Academic Press, New-York, 1958, Chap. 6, p. 214.
83. GRAY (E.G.) and WHITTAKER (V.P.). — The isolation of nerve endings from brain : an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. J. Anat., 1962, **96**, 79-88.
84. GRIGNARD (V.), DUPONT (G.) et LOCQUIN (R.). — Traité de Chimie organique. Masson Ed. Paris, 1945, Tome XI. Fascicule I, pp. 78-101.

85. GULATI (O.D.) and STANTON (H.C.). — Some effects on the central nervous system of gamma-aminobutyric acid and certain related amino-acids administered systematically and intracerebrally to mice. *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 1960, **129**, 178-185.
86. HARDING (F.). — Quelques aspects du métabolisme du Tryptophane. Thèse d'Ingénieur-Docteur, Paris, 1961.
87. HARDING-GAUDIN (F.). — Test de surcharge en Tryptophane. Difficulté d'interprétation des résultats pour le diagnostic de carences vitaminiques chez le rat (vitamines B₁-B₂-B₆). *Nouv. rev. Franç. hémat.*, 1961, **1**, 417-421.
88. HARDMAN (J.K.) and STADTMAN (T.C.). — Metabolism of ω -amino acids. III. Mechanism of conversion of gamma-aminobutyrate to gamma-hydroxybutyrate by *Clostridium aminobutyricum*. *J. Biol. Chem.*, 1963, **238**, 2081-2087 et 2088-2093.
89. HAYASHI (T.). — The inhibitory action of β -hydroxy- γ -aminobutyric acid upon the seizure following stimulations of the motor cortex of dogs. *J. Physiol. G.B.*, 1959, **145**, 570-575.
90. HAYASHI (T.) and NAGAI (K.). — Action of ω -amino acids on the motor cortex of higher animals, especially gamma-amino-bêta-hydroxybutyric acid as the real inhibitory principle of brain, in : *Abst XX Internat. Physiol. Congress*, 1956, p. 410-415.
91. HEBB (C.O.) and SILVER (A.). — Choline-acetylase in the central nervous system. *J. Physiol.*, 1956, **134**, 718-728.
92. HESS (S.), CONNAMACHER (R.H.), OZAKI (M.) and UDENFRIEND (S.). Effects of α -methyldopa and α -methyl-m-tyrosine on metabolism of norepinephrine and serotonin. *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 1961, **134**, 129-138.
93. HESTRIN (S.). — The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical explication. *J. Biol. Chem.*, 1949, **180**, 249-261.
94. HIRS (C.W.H.), MOORE (S.) and STEIN (W.H.). — A chromatographic investigation of pancreatic ribonuclease. *J. Biol. Chem.*, 1953, **200**, 493-506.

95. HIRCH (H.E.) and ROBINS (E.). — Distribution of γ -aminobutyric acid in the layers of the cerebral and cerebellar cortex. Implications for its physiological role. *J. Neurochem*, 1962, **9**, 63-70.
96. HOLTZ (P.). — Sympathin: - chemische Übertragung sympathischer Nervenenerregungen. *Klin. Wschr*, 1950, **28**, 145-151.
97. HOLZBAUER (M.) and BOGT (M.). — Depression by reserpine of the noradrenaline concentration in the hypothalamus of the cat. *J. Neurochem*, 1957, **1**, 8-11.
98. HOLZER (G.) and HORNYKIEWICZ (O.). — Hydroxytryptamine metabolism in the brain of the cat. *Arch. Exper. Pathol. Pharmacol.*, 1959, **237**, 27-33.
99. HONOUR (A.J.) and Mc LENNAN (H.). The effect of γ -aminobutyric acid and other compound on structures of the mammalian nervous system which are inhibited by Factor I. *J. Physiol. G.B.*, 1960, **150**, 306-318.
100. INOUÉ (K.). — Biosynthesis of γ -amino β -hydroxybutyric acid from γ -aminobutyric acid in brain. *J. Jap. Biochem. Soc.*, 1959. Cité par TOWER (D.B.). — *Neurochemistry of Epilepsy*. Thomas Pub. Springfield, Illinois. U.S.A., 1960, pp. 63-121.
101. IRREVERRE (F.), EVANS (R.L.), HAYDEN (A.R.) and SILBER (R.). — Occurrence of gamma-guanidinobutyric acid. *Nature*, 1957, **180**, 704-706.
102. ISHERWOOD (F.A.), MAPSON (L.W.) and CHEN (Y.T.). — Synthesis of L-ascorbic acid in rat liver homogenates. Conversion of L-gulono and L-galactono- γ lactone and the respective acids into L-ascorbic acid. *Biochem. J.*, 1960, **76**, 157-171.
103. ISHIKAWA (S.), NOGUCHI (K.) and YAMADA (K.). — Enzymatic system concerning the metabolism of L-gulonic acid. *Kôso Kagaku shinpojium*, 1958, **13**, 276-286. Discussion : 358-359.
104. IWAMA (K.) and JASPER (H.H.). — The action of gamma-aminobutyric acid upon cortical electrical activity in the cat. *J. Physiol.*, 1957, **138**, 365-368.

105. JERMYN (M.A.). — Studies on the glucono δ -lactonase of *Pseudomonas fluorescens*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **37**, 78-92.
106. JOHANSSON et SIBELIUS. — *Ber.*, 1918, **51**, 480. Cité par GRIGNARD (V.), DUPONT (G.) et LOCQUIN (R.). — *Traité de Chimie Organique*. Masson Ed. Paris, 1945, Tome XI, fascicule I, p. 78-101.
107. JOUANY (J.M.), GERARD (J.), LABORIT (H.) et CARLO (P.). — Action de la butyrolactone en association avec des composés ammoniogénétiques. *C.R. Soc. Biol.*, 1960, **154**, 2039-2042.
108. JOUVET (M.). — Recherches sur les structures nerveuses et les mécanismes responsables des différentes phases du sommeil physiologique. *Arch. Ital. Biol.*, 1962, **100**, 125-206.
109. JOUVET (M.), CIER (A.), MOUNIER (D.) et VALATX (J.L.). — Effet de la 4-butyrolactone et du 4-hydroxybutyrate de Na sur l'électro-encéphalogramme et sur le comportement du chat. *C. R. Soc. Biol.* 1961, **155**, 1313-1316.
110. JOUVET (M.), MICHEL (F.) et COURJON (J.). — Sur la mise en jeu de deux mécanismes à expression EEG différente au cours du sommeil physiologique chez le chat. *C. R. Acad. Sci.*, 1959, **248**, 3043-3045.
111. JOUVET (M.), MICHEL (F.) et MOUNIER (D.). — Analyse EEG comparée du sommeil physiologique chez le chat et chez l'Homme. *Rev. Neurol.*, 1960, **103**, 189-205.
112. KILLAM (K.F.). — Convulsant hydrazides. II : Comparison of electrical changes and enzyme inhibition induced by the administration of thiosemicarbazide. *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 1957, **119**, 263-271.
113. KILLAM (K.F.) and BAIN (J.A.) — Convulsant hydrazides. I : in vitro and in vivo inhibition of vitamin B₆ enzymes by convulsant hydrazides. *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 1957, **119**, 255-262.
114. KILLAM (K.F.), DASGUPTA (S.R.) and KILLAM (E.K.). — Studies of the action of convulsant hydrazides as vitamin B₆ antagonists in the central nervous system, in : « Inhibition in the nervous system and gamma-amino butyric acid », Roberts (E.) Ed. Pergamon Press, Oxford. London. New-York. Paris, 1960, pp. 302-315.

115. KLEIN (M.). — Etude polygraphique et phylogénique des états de sommeil. Thèse Méd. Lyon, 1963.
116. KOTAKE (Y.), OGASAWARA (N.) and HAGINO (Y.). — Xanthurenic acid. XXI: Kynurenine transaminase, kinureninase and elevated amount of excretion of xanthurenic acid. Proc. Japan Acad., 1962, **38**, 223-226.
117. KUFFLER (S.W.) and EDWARDS (C.). — Mechanism of gamma-aminobutyric acid (GABA) action and its relation to synaptic inhibition. J. Neurophysiol., 1958, **21**, 589-610.
118. KUNTZMAN (R.), SHORE (P.A.), BOGDANSKI (D.) and BRODIE (B.B.). — Microanalytical procedures for fluorometric assay of brain DOPA-5 HTP-decarboxylase, norepinephrine and serotonin, and a detailed mapping of decarboxylase activity in brain. J. Neurochem, 1961, **6**, 226-232.
119. KURIAKI (K.), YAKUSHIJI (T.), NORO (J.), SHIMIZU (T.) and SAJI (S.H.). — Gamma-aminobutyrylcholine. Nature, 1958, **181**, 1336-1338.
120. LABORIT (H.). — Pharmacologie du gamma-OH. Agressologie, 1963, **3**. Leçon d'introduction à l'étude de l'Agressologie, XX, n° 1, encart.
121. LABORIT (H.). — Les rapports neurono-névrogliques. Interprétation sur des bases expérimentales de leurs rôles en neurophysiologie et dans le mécanisme d'action des drogues psychotropes. Presse Méd., 1964, **72**, 1-5.
122. LABORIT (H.). — Sodium 4-hydroxybutyrate. Int. J. Neuropharmacol., 1964, **3**, 433-452.
123. LABORIT (H.), JOUANY (J.M.), GERARD (J.) et FABIANI (F.). — Résumé d'une étude expérimentale et clinique sur un substrat métabolique à action centrale inhibitrice: le 4-hydroxybutyrate de Na. Presse Méd., 1960, **68**, 1867-1869.
124. LABORIT (H.), JOUANY (J.M.), GERARD (J.) et FABIANI (F.). — Première note sur l'étude expérimentale et l'emploi clinique du 4-hydroxybutyrate de sodium en anesthésiologie et en neuropsychiatrie, in : Neuro-Psychopharmacology. Proceedings of the 2nd International Meeting of the Collegium Internationale Neuro-psychopharmacologicum. Basle, 1960, Rothlin Ed., 1961, Vol. 2.

125. LABORIT (H.), KIND (A.) et HOUDART (R.). — Gamma-OH en anesthésie neurochirurgicale. *Neurochirurgie*, 1962, **8**, 104-107.
126. LABORIT (H.), KIND (A.) et LEON-REGIL (C. de). — 220 cas d'anesthésie en neurochirurgie, avec le 4-hydroxybutyrate de sodium. *Presse Méd.*, 1961, **69**, 1216-1217.
127. LANGEMANN (H.). — Enzymes and their substrates in adrenal gland of ox. *Brit. J. Pharmacol.*, 1951, **6**, 318-324.
128. LECHNER (H.) and LEMBECK (F.). — Influence of substance P on the electric activity of the brain. *Arch. Pathol. Pharmac.*, 1958, **234**, 419-425.
129. LEHMANN (A.). — L'acide gamma-aminobutyrique est-il un inhibiteur du système nerveux central? *Thérapie*, 1963, **18**, 1509-1523.
130. LEVY (J.). — Doit-on impliquer la sérotonine dans les processus mentaux? in « *Actualités Pharmacologiques* ». Masson Ed. Paris, 1959, **12**, 193-238.
131. Mc CORMICK (D.B.), GUIRARD (B.M.) and SNELL (E.E.). — Comparative inhibition of pyridoxal-kinase and glutamic acid decarboxylase by carbonyl reagents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1960, **104**, 554-557.
132. Mc ILWAIN (H.) and RODNIGHT (R.). — Obtaining, fixing and extracting neural tissues. In « *Practical Neurochemistry* ». Churchill J. a. A., Ltd. London, 1962, p. 13-25.
133. Mc INTOSH (F.). — Distribution of acetylcholine in peripheral and central nervous system. *J. Physiol. G.B.*, 1941, **99**, 436-442.
134. Mc KHANN (G.M.), ALBERS (R.W.), SOKOLOFF (L.), MICKELSEN (O) and TOWER (D.B.). — The qualitative significance of the gamma-aminobutyric acid pathway in cerebral oxydative metabolism. In : « *Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid* ». Roberts (E.) Ed, Pergamon Press, Oxford. London. New-York. Paris, 1960, p. 169-181.

135. Mc LENNAN (H.). — A comparison of some physiological properties of and inhibitory factor from brain (Factor I) and of γ -aminobutyric acid and related compounds. *J. Physiol. G. B.*, 1957, **139**, 79-86.
136. Mc LENNAN (H.). — The identification of one active component from brain extracts containing factor I. *J. Physiol. G. B.*, 1959, **146**, 358-368.
137. MARRAZZI (A.S.). — Some indications of cerebral humoral mechanisms. *Science*, 1953, **118**, 367-370.
138. MARRAZZI (A.S.). — The effects of certain drugs on cerebral synapses. *Ann. New-York. Acad. Sci.*, 1956, **66**, 496-507.
139. MARRAZZI (A.S.). — Effects of psychomimetic drugs on cerebral synapses. In : « Psychotropic Drugs ». Elsevier Ed. Publish. Comp. Amsterdam, 1957, pp. 283-284.
140. MASSIEU (G.H.), TAPIA (R.), PASANTESO (H.) and ORTEGA (G.B.). — Convulsant effect of glutamic acid- γ -hydrazide by simultaneous treatment with pyridoxal phosphate. *Biochem. Pharmacol.*, 1964, **13**, 118-120.
141. MAYNERT (E.W.) and KAJI (H.K.). — On the relationship of brain gamma-aminobutyric acid to convulsions. *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 1962, **137**, 114-121.
142. MEISTER (A.). — Biochemistry of the amino-acids. Academic Press Inc. New-York, 1957, p. 340.
143. MICHEL (F.), KLEIN (M.), JOUVET (M.) et VALATX (J.L.). — Etude polygraphique du sommeil chez le rat. *C. R. Soc. Biol.*, 1961, **155**, 2389-2392.
144. MOORE (S.) and STEIN (W.H.). — Chromatography of amino-acids on sulfonated polystyrene resins. *J. Biol. Chem.*, 1951, **192**, 663-681.

145. MOORE (S.) and STEIN (W.H.). — Procedure for the chromatographic determination of amino-acids on four per cent crosslinked sulfonated polystyrene resins. *J. Biol. Chem.*, 1954, **211**, 893-906. Cité par : LEDERER (E.). — « Chromatographie en Chimie Organique et Biologique ». Masson Ed., Paris, 1960. Vol. 2, p. 331-385.
146. MOORE (S.) and STEIN (W.H.). — A modified ninhydrin reagents for the photometric determination of amino-acids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, 1954, **211**, 907-913. Cité par LEDERER (E.). — « Chromatographie en Chimie Organique et Biologique ». Masson Ed., Paris, 1960. Vol. 2, p. 331-385.
147. NOFRE (C.), WELIN (L.), PARNET (J.) et CIER (A.). — Action du radical libre hydroxyle sur les acides aminés. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1961, **43**, 1237-1245.
148. OGASAWARA (N.), HAGINO (Y.) and KOTAKE (Y.). — Kynurenine transaminase, kynureninase and the increase of xanthurenic acid excretion. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1962, **52**, 162-166.
149. ORENT-KEILES (E.R.). — Role of boron in diet of rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1940, **44**, 199-202.
150. PERLES (R.) et BENDA (P.). — Effet sur la vigilance de quelques dérivés α -halogénés de la γ -butyrolactone. *C. R. Soc. Biol.*, 1960, **154**, 2228-2230.
151. PERRAULT (M.) et CLAVEL (B.). — Une vitamine d'actualité : le phosphate de pyridoxal (vitamine B₆). *La semaine des Hôpitaux*, 1954, **30**, 1959-1961.
152. PISANO (J.J.), MITOMA (C.) and UDENFRIEND (S.). — Biosynthesis of γ -guanidinobutyric acid from γ -aminobutyric acid and arginine. *Nature*, 1957, **180**, 1125-1130.
153. PISANO (J.J.) and UDENFRIEND (S.). — Formation of γ -guanidinobutyric and guanidino acetic acids in brain. *Feder. Proc.*, 1958, **17**, 403.
154. PLETSCHER (A.), SHORE (P.A.) and BRODIE (B.B.). — Serotonin as a mediator of reserpine action in brain. *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 1956, **116**, 84-89.

155. PURPURA (D.P.), GIRADO (M.) and GRUNDFEST (H.). — Mode of action of aliphatic amino-acids on cortical synaptic activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1957, **95**, 791-795.
156. PURPURA (D.P.), GIRADO (M.) and GRUNDFEST (H.). — Central synaptic effects of ω -guanidine-acids and amino-acids derivatives. *Science*, 1958, **127**, 1179-1184.
157. QUASTEL (J.H.), TENNENBAUM (M.) and WHEATLEY (A.H.M.). — Choline ester formation in, and choline esterase activities of tissues in vitro. *Biochem. J.*, 1936, **30**, 1668-1681.
158. RABB (W.) and GIGEE (W.). — Concentration and distribution of « Enkephalin » in the brain of humans and animals. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1951, **76**, 97-100.
159. RACKER (E.). — *Physiol. Rev.*, 1955, **35**, 1. Cité par : FRUTON (J.S.) and SIMMONDS (S.) in « General Biochemistry ». Wiley (J.) and sons Ed. New-York, 1958, 2nd Ed. p. 312.
160. RICHTER (D.) and CROSSLAND (J.). — Variation in acetylcholine content of brain with physiologic state. *Amer. J. Physiol.*, 1959, **159**, 247-255.
161. ROBERTS (E.). — Free amino-acids of nervous tissue : some aspects of metabolism of gamma-aminobutyric acid. In : « Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid ». Roberts (E.) Ed. Pergamon Press. Oxford. London. New-York. Paris, 1960, pp. 144-158.
162. ROBERTS (E.). — Metabolism of gamma-aminobutyric acid in various areas of brain. In « Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid ». Roberts (E.) Ed. Pergamon Press. Oxford. London. New-York. Paris, 1960, pp. 324-339.
163. ROBERTS (E.) and FRANKEL (S.). — Glutamic decarboxylase in brain. *J. Biol. Chem.*, 1951, **188**, 789-792 ; **190**, 505-510.
164. ROBERTS (E.), FRANKEL (S.) and HARMAN (P.J.). — Amino-acids of nervous tissue. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1950, **74**, 383-387.
165. ROBERTS (E.), HARMAN (P.J.) and FRANKEL (S.). — Gamma-aminobutyric acid content and glutamic decarboxylase activity in developing mouse brain. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1951, **78**, 799-803.

166. ROBERTS (E.) and SIMONSEN (D.G.). Some properties of L-glutamic decarboxylase in mouse brain. *Biochem. Pharmacol.*, 1963, **12**, 113-134.
167. ROBERTS (E.), YOUNGER (F.) and FRANKEL (S.). — Influence of dietary pyridoxine on decarboxylase activity of brain. *J. Biol. Chem.*, 1951, **191**, 277-280.
168. ROSEN (F.), MILHOLLAND (R.J.) and NICHOL (C.A.). — Studies of the inhibition of L-glutamic acid decarboxylase in vivo. In : « Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid ». Roberts (E.). Ed. Pergamon Press, Oxford. London, New-York, Paris, 19560, pp. 338-343.
169. ROTHBALLER (A.B.). — Effects of catechol-amines on the central nervous system. *Pharmacol. Rev.*, 1959, **11**, 494-547.
170. RUBIN (B.A.) and GIARMAN (N.J.). — The therapy of experimental influenza in mice with antibiotic lactones and related compounds. *Yale. J. Biol. Med.*, 1957, **19**, 1017-1022.
171. SAMAYOA DE LÉON (R.), LÉON REGIL (C.A.). — Un nuovo prodotto en anestesiologia : el 4-hidroxibutirato de sodio. *Essayo clinico en 100 casas. Agressologie*, 1963, **4**, 175-193.
172. SANDMAN (R.P.). — The determination of gamma-aminobutyric acid in brain. *Anal. Biochem.*, 1962, **3**, 158-163.
173. SCHAYER (R.W.). — Studies of metabolism of β -C¹⁴ d-l-adrenalin. *J. Biol. Chem.*, 1951, **189**, 301-306.
174. SCHLENK. — The Enzymes. Summer (J.B.) and Myrback (K.) Ed. Academic Press, New-York, 1951, chap. 52.
175. SHARMAN (D.F.) and SMITH (S.E.). — The effect of α -methyldopa on the metabolism of 5-hydroxytryptamine in rat brain. *J. Neurochem.*, 1962, **9**, 403-406.
176. SISTROM (W.R.) and STANIER (R.Y.). — Lactonizing and lactone-splitting enzymes. *J. Biol. Chem.*, 1954, **210**, 821-825.

177. SMITH (S.E.). — The pharmacological actions of 3,4-dihydroxy-phenyl α -methylalanine (α -methyldopa) an inhibitor of 5-hydroxy-tryptophan decarboxylase. *Brit. J. Pharmacol.*, 1960, **5**, 319-327.
178. SMITH (S.E.) and DEWS (P.B.). — Antagonism of locomotor suppressant effects of reserpine in mice. *Psychopharmacologia*, 1962, **3**, 55-59.
179. SOURKES (T.L.), HENEAGE (P.) and TRANO (Y.). — Enzymatic decarboxylation of isomers and derivatives of dihydroxyphenylalanine. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, **40**, 185-189.
180. SPECTOR (S.), SHORE (P.A.) and BRODIE (B.B.). — Biochemical and pharmacological effects of the monoaminoxidase inhibitors, iproniazid, 1-phenyl-2-hydrazinopropane J.B. (516) and 1-phenyl-3-hydrazinobutane. *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 1960, **128**, 15-21.
181. SPORN (M.B.), DINGMAN (W.) and DEFALCO (A.). — A method for studying metabolic pathways in the brain of the intact animal. The conversion of proline to other amino-acids. *J. Neurochem.*, 1959, **4**, 141-147.
182. STADTMAN (E.R.) and BARKER (H.A.). — Fatty acid synthesis by enzyme preparations of *Clostridium Kluyveri*. VI: Reactions of acetylphosphates. *J. Biol. Chem.*, 1950, **184**, 769-793.
183. STEDMAN (E.) and STEDMAN (E.). — Mechanism of biological synthesis of acetylcholine; isolation of acetylcholine produced by brain tissue in vivo. *Biochem. J.*, 1937, **31**, 817-827.
184. TALLAN (H.H.). — A survey of the amino-acids and related compounds in nervous tissue. In: «Amino-acid pools». HOLDED (J.T.). Ed. Elsevier pub. Amsterdam, 1962, p. 471-485.
185. TALLAN (H.H.), MOORE (S.) and STEIN (W.H.). — Free amino-acids and related compounds in the tissue of the cat. *J. Biol. Chem.*, 1954, **211**, 927-939.
186. TOWER (D.B.). — Neurochemical aspects of pyridoxine metabolism and function. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 1956, **4**, 329-342.
187. TOWER (D.B.). — Glutamic acid metabolism in the mammalian central nervous system. In: «Biochemistry of the Central Nervous System». BRÜCKE (F.). Ed. Pergamon Press, Oxford, London, New-York, Paris, 1959, pp. 213-229.

188. TOWER (D.B.). — Cerebral amino-acids metabolism and vitamin B₆. in « Neurochemistry of Epilepsy ». TOWER (D.B.). Ed. Thomas pub. Springfield. Illinois. U.S.A., 1960, pp. 63-121.
189. TSUDAKA (Y.), HIRANO (S.), NAGATA (Y.) and MATSUTANI (T.). — Metabolic studies of gamma-aminobutyric acid in mammalian tissues, in : « Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid ». ROBERTS (E.). Ed. Pergamon Press. Oxford. London. New-York. Paris, 1960, pp. 163-168.
190. TSUJI (H.), BALAGOT (R.C.) and SADOVE (M.S.). — Effect of anesthetics on brain gamma-aminobutyric acid and glutamic acid levels. J. Amer. Med. Ass., 1963, **183**, 659-661.
191. TURSKY (T.) and SAJTER (V.). — The influence of potassium cyanide poisoning on the gamma-aminobutyric acid level in rat brain. J. Neurochem, 1962, **9**, 519-523.
192. UDENFRIEND (S.). — Amino-acids, amines and their metabolites in « Fluorescence essay in Biology and Medicine ». Vol. 3 : Molecular Biology. KAPLAN (N.O.) and SCHERAGA (N.A.). Ed. Academic Press. New-York, 1962, pp. 127-190.
193. UDENFRIEND (S.), PISANO (J.J.) and WILSON (J.D.). — The presence of a peptide in brain containing gamma-aminobutyric acid and histidine. in : « The regional chemistry, physiology and pharmacology of the nervous system ». Proceedings of the fourth International Neurochemical Symposium. Varenna, Italy. KETY (S.S.) and ELKES (J.). Ed. Pergamon Press. Oxford. London. New-York. Paris, 1961, pp. 348-350.
194. UDENFRIEND (S.), WEISSBACH (H.) and BOGDANSKI (D.F.). — Increase in tissue serotonin following administration of its precursor 5-hydroxytryptophan. J. Biol. Chem., 1957, **224**, 803-810.
195. VAN GELDER (N.M.) and ELLIOTT (K.A.C.). — Disposition of gamma-aminobutyric acid administered to mammals. J. Neurochem., 1958, **3**, 139-143.
196. VERNADAKIS (A.) and WOODBRURY (D.M.). — Effects of diphenylhydantoin and adrenocortical steroids on free glutamic acid, glutamine and gamma-aminobutyric acid concentration of rat cerebral cortex, in « Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid. ROBERTS (E.). Ed. Pergamon Press. Oxford. London. New-York. Paris, 1960, pp. 242-248.

197. VOGT (M.). — Sympathomimetic amines in the central nervous system, normal distribution and changes produced by drugs. Brit. Med. Bull., 1957, **13**, 166-171.
 198. VOGT (M.). — Symposium of catecholamines. V : Central actions of catecholamines. Catecholamines in brain. Pharmacol. Rev., 1959, **11**, 483-489.
 199. VOGT (M.), GUNN (C.G.) and SAWYER (C.H.). — Electroencephalographic effects of intra-ventricular 5-HT and LSD in the cat. Neurology, 1957, **7**, 599-566.
 200. WALLACH (D.P.). — Studies on the GABA pathway. I : the inhibition of gamma-aminobutyric acid - alphaketoglutaric acid transaminase in vitro and in vivo by U-7524 (amino-oxiacetic acid). Biochem. Pharmacol., 1960, **5**, 323-331.
 201. WALLACH (D.P.). — The inhibition of γ -aminobutyric acid - α -ceto-glutaric acid transaminase in vitro and in vivo by amino-oxiacetic acid. Biochem. Pharmacol., 1961, **6** : 166-170.
 202. WEIMBERG (R.). — Pentose oxidation by *Pseudomonas fragi*. J. Biol. Chem., 1961, **236**, 629-635.
 203. WINKELMAN (J.) and LEHNINGER (L.). — Aldono - and uronolactonases of animal tissues. J. Biol. Chem., 1958, 794-799.
 204. WOOLLEY (D.W.) and SHAW (E.N.). — Evidence for the participation of serotonin in mental processes. Ann. New-York Acad. Sci., 1957, **66**, 649-667.
 205. ZETLER (G.). — Substanz P, ein Polypeptid ans Darm und Gehirn mit depressiven, hyperalgetischen und Morphin antagonistischen Wirkungen auf das Zentral nervensystem. Arch. Exper. Pathol. Pharmacol., 1956, **228**, 513-538.
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	17
PREMIÈRE PARTIE. — GÉNÉRALITÉS	19
CHAPITRE 1. — Importance des facteurs chimiques neuro-humoraux dans l'activité corticale	21
1. - Acétylcholine	21
2. - Catécholamines et 5-Hydroxytryptamine	23
3. - Substance P	28
4. - Acide gamma-aminobutyrique	28
5. - 4-Butyrolactone et sommeil physiologique	32
CHAPITRE 2. — La 4-Butyrolactone	35
1. - Synthèse et propriétés physico-chimiques	35
2. - Dosage dans l'organisme	37
3. - Toxicité	39
4. - Propriétés physiologiques et pharmacologiques	39
5. - Lactonisation - délactonisation en Biochimie	48
DEUXIÈME PARTIE. — TRAVAIL PERSONNEL	51
CHAPITRE 1. — Protocole expérimental	53
1. - Mise en jeu d'une carence en pyridoxine	53
1. - Choix de l'espèce animale	53
2. - Réalisation de la carence	54
3. - Technique de contrôle de l'avitaminose B ₆	55

2. - Effets de la carence en pyridoxine sur la teneur en amino-acides du tissu cérébral	60
1. - Extraction et détermination qualitative des acides aminés du cerveau	61
2. - Dosage de l'acide gamma-aminobutyrique	63
3. - Effets de la butyrolactone chez le rat normal ou carencé en pyridoxine	74
1. - Action hypnogène	74
2. - Dosage de l'acide gamma-aminobutyrique	75
 CHAPITRE 2. - Résultats expérimentaux	76
1. - Contrôle de l'avitaminose B ₆	76
2. - Effets de la carence en pyridoxine sur la teneur en amino-acides du tissu cérébral	83
1. - Chromatographie des acides aminés	83
2. - Dosage de l'acide gamma-aminobutyrique	85
3. - Surcharge en phosphate de pyridoxal et taux d'acide gamma-aminobutyrique présents dans le cerveau chez les rats carencés ou non en pyridoxine	87
3. - Action de la butyrolactone chez le rat normal ou carencé en pyridoxine	88
1. - Effets hypnogènes de la butyrolactone	88
2. - Influence d'une surcharge en phosphate de pyridoxal	90
3. - Effets de la butyrolactone sur les taux d'acide gamma-aminobutyrique présents dans le cerveau chez les rats carencés ou non en pyridoxine	91
 CHAPITRE 3. — Discussion des résultats - Essais d'interprétation	93
1. - Validité des techniques et conditions expérimentales adoptées	93
1. - Réalisation de la carence en pyridoxine	93
2. - Techniques de dosage des acides aminés	94
3. - Action physiologique et pharmacologique de la butyrolactone	95

2. - Relations entre butyrolactone, vitamine B ₆ et acide gamma-aminobutyrique	96
3. - Recherches d'un mécanisme possible de l'activité de la butyrolactone	97

CONCLUSIONS	103
-----------------------	-----

BIBLIOGRAPHIE	105
-------------------------	-----
